



Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

**CONTRIBUCIÓN A LA COMPRENSIÓN DE LA
MICROCIRCULACIÓN PERIFÉRICA Y A SU REGULACIÓN A
TRAVÉS DE LOS COMPONENTES OSCILATORIOS DE FLUJO
MEDIDO POR LÁSER DOPPLER**

Tesis Doctoral presentada por

Henrique Nuno Nazaré e Silva



Departamento Medicina y
Especialidades Médicas



Escola de Ciências e
Tecnologias da Saúde

En virtud del acuerdo de colaboración con la Universidade Lusófona

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud
Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde

CONTRIBUCIÓN A LA COMPRENSIÓN DE LA MICROCIRCULACIÓN PERIFÉRICA Y
A SU REGULACIÓN A TRAVÉS DE LOS COMPONENTES OSCILATORIOS DE FLUJO
MEDIDO POR LÁSER DOPPLER

CONTRIBUIÇÃO PARA A COMPREENSÃO DA MICROCIRCULAÇÃO PERIFÉRICA E
DA SUA REGULAÇÃO ATRAVÉS DOS COMPONENTES OSCILATÓRIOS DO FLUXO
MEDIDO POR LASER DOPPLER

Tesis Doctoral presentada por:

Henrique Nuno Nazaré e Silva

DIRECTORES:

Professora Doutora Maria Julia Buján

Professor Doutor Luís Monteiro Rodrigues

CO-DIRECTOR:

Professor Doutor Hugo Ferreira

Alcalá de Henares, 2016

***Melchor Álvarez de Mon Soto, Catedrático de Medicina, y Director
del Departamento de Medicina y Especialidades Médicas de la
Universidad de Alcalá,***

INFORMA QUE:

El trabajo de investigación presentado por **D. Henrique Nuno Nazaré e Silva** denominado *“Contribución a la comprensión de la microcirculación periférica y a su regulación a través de los componentes oscilatorios de flujo medido por láser doppler”* reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficiente para ser defendido como tesis doctoral ante el tribunal que legalmente proceda.

Y para que conste donde proceda, a los oportunos efectos, se firma la presente en Alcalá de Henares a veintinueve de junio de dos mil dieciséis.





Doña M. Julia Buján Varela, Catedrática de Histología e Ingeniería Tisular del Departamento de Medicina y Especialidades Médicas y **Don Luis Monteiro Rodrigues**, Profesor Doutor de Fisiología Humana y Patofisiología de la Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologías de Lisboa, como directores de la presente tesis doctoral

CERTIFICAN: que el trabajo titulado *"Contribución a la comprensión de la microcirculación periférica y a su regulación a través de los componentes oscilatorios de flujo medido por láser doppler"* ha sido realizado por **Don Henrique Nuno Nazaré e Silva** en el Departamento de Medicina y Especialidades Médicas y reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos suficientes para ser defendido en calidad de Tesis Doctoral ante el tribunal que corresponda.

Y para que así conste donde proceda expiden y firman la presente certificación, en Alcalá de Henares, a 7 de Julio de dos mil dieciséis.

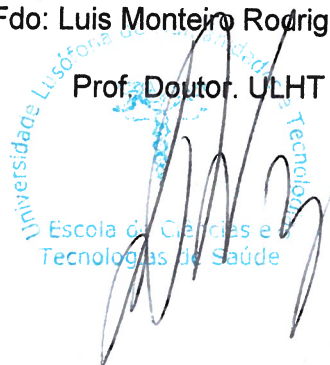
Fdo: M Julia Buján Varela

Catedrática UAH



Fdo: Luis Monteiro Rodrigues

Prof. Doutor. ULHT



Índice

Agradecimentos.....	vi
Resumo.....	vii
Summary.....	ix
Lista de abreviaturas e acrónimos.....	x

CAPÍTULO I : INTRODUÇÃO.....1

1.1. Função vascular.....	1
1.1.1 Princípios físicos da circulação sanguínea	3
1.1.2. Circulação periférica	7
1.1.3. A microcirculação	9
1.1.3.1. Regulação de curta duração da perfusão	11
1.1.3.2. Regulação de longa duração da perfusão	15
1.2. Estudo <i>in vivo</i> da microcirculação.....	16
1.2.1. Anatomia funcional do membro inferior humano	16
1.2.2. Anatomia funcional do membro posterior do murganho	20
1.2.3. A pele como modelo de estudo da microcirculação	23
1.2.4. A circulação cutânea humana	24
1.2.5. Diferenças anátomo-funcionais cutâneas do humano e do murganho.....	26
1.2.6. Principais técnicas e métodos de avaliação não-invasiva da microcirculação.....	27
1.2.6.1. Capilaroscopia	28
1.2.6.2. Fotopletismografia	28
1.2.6.3. Fluxometria por laser Doppler (LDF)	29
1.2.6.4. Imagem por laser Doppler (LDI)	29
1.2.6.5. Imagem por ressonância magnética	30
1.2.6.6. Imagem por polarização espectral ortogonal ⁽¹⁰⁴⁾	30
1.2.7. Métodos.....	31

CAPÍTULO II : OBJETIVOS, MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
2.1. Primeiro objetivo: desenvolver metodologias que permitam obter parâmetros funcionais microcirculatórios <i>in vivo</i> em indivíduos saudáveis de diferentes idades, e caracterizar eventuais alterações relacionadas com o envelhecimento	32
2.1.1 Tecnologias de medição	33
2.1.1.1. Técnicas	33
2.1.1.1.1. Fluxometria por laser Doppler (LDF)	33
2.1.1.1.2. Gasimetria transcutânea	37
2.1.1.1.3. Evaporimetria	38
2.1.1.2. Métodos experimentais.....	41
2.1.1.2.1. Participantes do estudo	41
2.1.1.2.2. Testes dinâmicos	42
2.1.1.2.3. Determinação do índice tornozelo-braço (ITB).....	47
2.1.1.2.4. Caracterização dos protocolos experimentais – determinação de parâmetros descritivos.....	48
2.2. Segundo objetivo: encontrar as melhores ferramentas de análise fina do sinal de LDF50	
2.2.1. Transformada rápida de Fourier (FFT)	53
2.2.2. Transformada de ondeleta (WT).....	53
2.2.3. Análise de Flutuação Retificada (DFA)	54
2.2.4. Análise de entropia à multiescala (MSE)	56
2.2.5. Estratégia para o processamento do sinal de LDF e análise estatística	56
2.3. Terceiro objetivo: desenvolver um modelo animal que permita testar os instrumentos até aqui desenvolvidos, olhando mais aprofundadamente, se possível, para os fenómenos em causa	61
2.3.1. Animais	62
2.3.2. Tecnologias de medição	62
2.3.3. Testes dinâmicos.....	64

CAPÍTULO III : RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
3.1. Primeiro objetivo: desenvolver metodologias que permitam obter parâmetros funcionais microcirculatórios <i>in vivo</i> em indivíduos saudáveis de diferentes idades, e caracterizar eventuais alterações relacionadas com o envelhecimento	66
3.1.1. Elevação passiva da perna	66
3.1.1.1. Comparação de grupos	69
3.1.1.2. Comparação de sexos	74
3.1.2. Oclusão supra-sistólica	77
3.1.2.1. Comparação por grupo	81
3.1.2.2. Comparações de sexo	84
3.1.3. Respiração de oxigénio a 100%	87
3.1.3.1. Comparação de grupos	91
3.1.3.2. Comparações de sexo	94
3.1.4. Relações de perfusão - barreira epidérmica	97
3.2. Segundo objetivo: encontrar as melhores ferramentas de análise fina do sinal de LDF.....	98
3.2.1. Transformada de ondeleta (WT)	98
3.2.1.1. Elevação passiva da perna.....	98
3.2.1.2. Oclusão supra-sistólica.....	103
3.2.1.3. Respiração de oxigénio	108
3.2.2. Análise de Flutuação Retificada (DFA).....	116
3.2.2.1. Elevação passiva da perna.....	116
3.2.2.2. Oclusão supra-sistólica.....	120
3.2.2.3. Respiração de oxigénio	124
3.2.3. Análise de entropia à multiescala (MSE)	128
3.2.3.1. Elevação passiva da perna.....	128
3.2.3.2. Oclusão supra-sistólica.....	132
3.2.3.3. Respiração de oxigénio	135

3.3. Terceiro objetivo: desenvolver um modelo animal que permita testar os instrumentos até aqui desenvolvidos, olhando mais aprofundadamente, se possível, para os fenómenos em causa	138
3.3.1. Grupo controlo	139
3.3.2. Grupo de isquémia do membro posterior.....	141
3.3.2.1. Comparação de técnicas	141
3.3.3. Análise espectral do sinal de LDF de murganhos.....	149
3.3.4. Transformada de ondeleta (WT)	153
3.3.4.1. Grupo controlo	153
3.3.4.2. Grupo de isquémia do membro posterior	157
3.3.5. Análise de Flutuação Retificada.....	163
3.3.5.1. Grupo controlo	163
3.3.5.2. Grupo de isquémia do membro posterior	166
3.3.6. Análise de entropia à multiescala.....	171
3.3.6.1. Grupo controlo	171
3.3.6.2. Grupo de isquémia do membro inferior	175
 CAPÍTULO IV : CONCLUSÕES.....	180
CAPÍTULO V : REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	186
 Anexo 1.....	204
Anexo 2.....	208

“Real knowledge is to know the extent of one's ignorance”

Confucius

Agradecimentos

Gostaria de expressar o meu agradecimento a todas as pessoas que tornaram este trabalho possível, em especial:

Ao Professor Doutor Luís Monteiro Rodrigues, orientador desta tese, por toda a orientação, apoio, rigor, paciência e incentivo em cada momento, e por todas as oportunidades que me deu desde que se iniciou a nossa colaboração.

À Professora Doutora Maria Julia Buján Varela, orientadora desta tese, pela possibilidade de realização deste projeto da Universidad de Alcalá, e pela orientação dada ao longo do projeto.

Ao Professor Doutor Hugo Ferreira, co-orientador desta tese, por todo o apoio e orientação dados, pelo seu otimismo constante, e por me ter despertado o interesse pela análise dos sinais biológicos.

Aos Doutores Alain-Pierre Gadeau e Thierry Couffinhal, pela possibilidade de realizar no INSERM U1034 uma parte muito importante deste trabalho, e por todo o seu apoio durante a minha estadia em França.

Ainda do INSERM U1034, à Doutora Marie-Ange Renault, pela realização da intervenção cirúrgica nos animais, ao Jérôme Guignard pela disponibilização dos animais, ao Guillaume Rucher pela ajuda na atividade experimental com os animais, e à Christelle Boullé por todo o apoio logístico.

Ao Dr. Osvaldo Santos por toda a ajuda com a análise estatística.

A todos os indivíduos que acederam a participar neste estudo, sem os quais o mesmo não teria sido possível.

A toda a equipa da Perimed, em particular aos Drs. Kjell Bakken, Björn Bakken, Achille Moneta and Karin Larsson, pela sua disponibilidade e ajuda técnica durante este percurso.

À Joana Antunes, pela ajuda na recolha de dados durante a fase mais crucial do projeto.

Ao Pedro Henriques pela elaboração das ilustrações desta tese.

Aos meus colegas Catarina Rosado, Tânia Almeida, Catarina Reis, Ana Sofia Fernandes, Patrícia Rijo, Nuno Saraiva e João Costa, por todo o apoio e incentivo dados durante este percurso.

À D. Teresa Costa, D. Florência Prata, D. Isabel Barroso, Paula Almeida e Marisa Costa, por todo o apoio logístico.

Aos meus amigos João Nunes, Francisco Rêgo, Francisco Martinho, pelas importantes discussões que motivaram o avanço deste projeto.

Aos meus pais pelo seu apoio incondicional.

A todos os meus amigos que me incentivaram ao longo deste percurso.

À Andreia por todo o seu apoio.

RESUMO

A microcirculação refere-se ao conjunto dos vasos sanguíneos com calibre inferior a 150 μm responsáveis pelo transporte de oxigénio e nutrientes para as células e de produtos do metabolismo para os sistemas de eliminação. O fluxo sanguíneo microcirculatório é regulado de forma complexa, por mecanismos intrínsecos e extrínsecos aos próprios tecidos. Qualquer disfunção que ocorra numa rede microvascular poderá comprometer a viabilidade tecidual

A pele tem sido explorada, desde há vários anos, como um modelo potencialmente representativo dos fenómenos de regulação normal e alterada do fluxo sanguíneo microcirculatório, em larga medida devido à facilidade de acesso à sua rede microvascular. O estudo da microcirculação cutânea tem sido progressivamente facilitado pelo desenvolvimento de diversas tecnologias não invasivas, como é o caso da fluxometria por laser Doppler (LDF) e da gasimetria transcutânea, entre as mais utilizadas. Por último, é cada vez mais frequente realizar manobras de provocação que visam alterar as condições iniciais de perfusão e induzir respostas compensatórias, aumentando a sensibilidade da análise. Contudo, muitas destas tecnologias registam fenómenos oscilatórios de natureza complexa e de difícil interpretação, o que limita o acesso a esta informação *in vivo*.

A exploração do sinal de LDF, em particular dos seus componentes oscilatórios, torna-se essencial para o estudo da regulação da microcirculação em condições de perfusão normal e alterada, pelo que orientámos o presente estudo no sentido de aprofundar o nosso conhecimento sobre estes temas através da questão *“qual a contribuição dos componentes oscilatórios do sinal de LDF para a regulação da função microcirculatória”*?

Para responder a esta pergunta estabelecemos os seguintes objetivos:

- (i) desenvolver metodologias que permitam obter parâmetros funcionais microcirculatórios *in vivo* em indivíduos saudáveis de diferentes idades e caracterizar eventuais alterações relacionadas com o envelhecimento;
- (ii) encontrar as melhores ferramentas de análise fina do sinal de LDF;
- (iii) desenvolver um modelo animal que permita testar os instrumentos até aqui desenvolvidos, olhando mais aprofundadamente, se possível, para os fenómenos em causa;

Para o primeiro objetivo foram estudados dois grupos de indivíduos saudáveis – um grupo de 35 indivíduos jovens, com idades compreendidas entre os 18 e os 30 anos ($22,1 \pm 3,7$), e um grupo de 30 indivíduos saudáveis, mais velhos, com idades compreendidas entre os 40 e os 65 anos ($50,8 \pm 7,6$). Em ambos os grupos foram registados sinais de LDF, de pressão transcutânea de oxigénio (tcpO_2) e de perda transepidérmica de água (PTEA) durante a realização de três protocolos experimentais – elevação passiva da perna, oclusão supra-sistólica ao nível do tornozelo e respiração de oxigénio a 100%. Para o segundo objetivo foram aplicadas três ferramentas de análise – a transformada de wavelet (WT), a análise de flutuação retificada (DFA) e a análise de entropia à multiescala (MSE). Para o terceiro objetivo foi utilizado um grupo de 16 murganhos C57BL/6 com idades entre as 8 e as 27 semanas, tendo sido submetidos à respiração de oxigénio a 100% enquanto sedados e outro grupo de 9 murganhos de 16 semanas aos quais foi induzida isquémia unilateral do membro posterior, submetidos ao protocolo de respiração de oxigénio a 100%, antes e depois desta indução.

Os resultados obtidos pelos objetivos, permitiram chegar às seguintes conclusões:

- (i) o protocolo de elevação passiva da perna provoca uma resposta vascular semelhante à encontrada no protocolo de oclusão supra-sistólica, podendo ser utilizado como alternativa a este; ambos induzem respostas hiperémicas compensatórias comparáveis. A oclusão permitiu revelar uma relação inversa entre a amplitude do sinal de LDF e a amplitude da PTEA, o mais importante indicador da função de “barreira” epidérmica;
- (ii) o protocolo de respiração de oxigénio a 100% é o mais fácil de aplicar no humano. O padrão de resposta envolve na maioria dos casos diminuição da perfusão / vasoconstrição embora o aumento da perfusão / vasodilatação também tenha sido observado. No entanto, a análise dos sinais de LDF não permitiu encontrar diferenças estatisticamente significativas nas respostas vasculares entre indivíduos de idades diferentes. Já a gasimetria transcutânea permitiu encontrar menores níveis de tcpO_2 em indivíduos mais velhos, refletindo uma redução da capacidade de extração de oxigénio. A relação inversa entre o sinal de LDF e a PTEA foi aqui consistentemente registada.
- (iii) as análises de WA e de MSE foram as que demonstraram maior interesse na comparação das alterações das propriedades dos sinais de LDF entre as diferentes

fases de cada protocolo e na comparação de indivíduos de diferentes idades. O protocolo de elevação passiva da perna foi o único que permitiu encontrar diferenças nas respostas vasculares, avaliadas por LDF, entre indivíduos de diferentes idades – indivíduos mais velhos apresentam um maior nível de perfusão basal, explicada por uma maior atividade miogénica, com menor nível de entropia, e respondem à manobra de elevação com uma maior atividade miogénica e simpática juntamente com uma menor atividade endotelial independente de monóxido de azoto (NO) face aos indivíduos mais jovens;

(iv) O modelo animal revelou:

- a. Como no humano, um padrão de resposta vascular à respiração de oxigénio a 100% semelhante, com diminuição da perfusão / vasoconstrição e aumento da perfusão / vasodilatação;
- b. Neste modelo, após a indução da isquémia do membro posterior, o membro controlo respondeu consistentemente com diminuição de perfusão enquanto que o membro isquémico respondeu com aumento de perfusão;
- c. Ainda como nos humanos, conseguimos identificar, no murganho, seis bandas espectrais no sinal de LDF, compatíveis com as seguintes atividades: cardíaca (5,3-4,6 Hz), respiratória (3,8-3,2 Hz), miogénica (0,17-0,059 Hz), simpática (0,052-0,020 Hz), endotelial NO-dependente (0,017-0,0094 Hz), e endotelial NO-independente (0,0084-0,0042 Hz);
- d. Tratar-se de um modelo adequado para o estudo da fisiologia e da patofisiologia circulatórias;

(v) A análise de wavelet é aquela que melhor permite compreender a contribuição dos diferentes determinantes que competem para a regulação da microcirculação durante a resposta às diferentes condições de perfusão experimentalmente desenvolvidas. A resposta de diminuição da perfusão / vasoconstrição relacionada com a hiperóxia parece dever-se à redução de ambas as componentes endoteliais, em ambos os modelos.

Palavras-chave: fluxometria por laser Doppler, análise de componentes, transformada de wavelet (WT), detrended fluctuation analysis (DFA), multiscale entropy analysis (MSE)

SUMMARY

Microcirculation refers to blood vessels with a diameter lesser than 150 μm , responsible for the transport of oxygen and nutrients and removal of waste products to elimination systems to and from cells. The tissue's microcirculatory blood flow regulation is complex and involves intrinsic and extrinsic mechanisms. Any dysfunction occurring in a given microvascular network might compromise the tissue viability and function. For many years, the skin has been explored as a model to study normal and abnormal microcirculatory blood, potentially representing flow regulation phenomena. The ease of access to its microvascular network is a major favorable argument. Also, the study of microcirculation has been progressively facilitated by the development of several non-invasive technologies, such as the laser Doppler flowmetry (LDF) and the transcutaneous gasimetry, some of the most used. Finally, provocation maneuvers aiming to change the initial perfusion conditions through which reflex responses are evoked are also frequently used, and contribute to increased analysis sensitivity. However, these technologies record oscillatory phenomena complex in nature and difficult to interpret, which limits the *in vivo* utility of this information.

To explore these oscillatory components of the LDF signal, in particular, it becomes essential to look further into normal and altered perfusion regulation conditions. Thus, the present study is designed to deepen our knowledge on these matters through the question "*how do LDF oscillatory components contribute to the regulation of microcirculatory function*"? To answer this question the following objectives were established:

- (i) to develop methodologies that will allow to obtain functional microcirculatory parameters *in vivo* in healthy patients of different ages, and to characterise eventual changes related to ageing;
- (ii) to find the best calculation tools to refine the analysis of LDF signal;
- (iii) to develop an animal model that allows us to test the best instruments developed, looking deeper, if possible, into the related phenomena;

For the first objective, two groups of healthy volunteers were studied – one group of 35 healthy volunteers, aged between 18 and 30 years old (22.1 ± 3.7), and one other group of

30 volunteers, also healthy but older, aged between 40 and 65 years old (50.8 ± 7.6). In both groups the LDF, transcutaneous oxygen pressure (tcpO_2) and transepidermal water loss (TEWL) signals were recorded following the application of three experimental protocols – passive leg raising, suprasystolic occlusion at ankle level, and 100% oxygen breathing. For the second objective, three analytical tools were applied – the wavelet transform (WT), the detrended fluctuation analysis (DFA), and the multiscale entropy analysis (MSE). For the third objective, one group of 16 C57BL/6 mice was used, aged between 8 and 27 weeks old, submitted to a 100% oxygen breathing while anesthetized, and another group of 9 mice, 16 weeks old, submitted to an unilateral hindlimb ischemia, breathing 100% oxygen before and after procedure.

Results obtained by objectives, allowed the following conclusions :

- (i) the passive leg raising protocol provokes a similar vascular response to the one obtained with the suprasystolic occlusion protocol, and might be used as an alternative; they both induce comparable compensatory hyperemic responses. Occlusion revealed a reciprocal relationship between LDF and TEWL, the most important indicator of epidermal “barrier” function;
- (ii) the 100% oxygen breathing protocol is the easiest to apply in humans. The response pattern consists in perfusion reduction/vasoconstriction in the majority of the cases, although perfusion increase / vasodilation has also been observed. Nevertheless, LDF signal analysis did not reveal statistically significant differences between vascular responses of patients with different ages. Transcutaneous gasimetry have shown lower tcpO_2 in older patients, reflecting a reduction in the capacity of extracting oxygen. The reciprocal relationship between LDF and PTEA was clearly confirmed;
- (iii) The WT and MSE analysis demonstrated higher value for comparing LDF changes in the different phases of each protocol, and for comparing patients of different ages; the passive leg raising found differences in the vascular responses, evaluated with LDF, between patients of different ages. Older patients exhibited a higher baseline perfusion level, explained by a larger myogenic activity, with a lower entropy level, and responded to the raising maneuver with higher myogenic and sympathetic activities, together with a lower NO independent endothelial activity, when compared with younger patients;

- (iv) The animal model revealed:
- a. a pattern of vascular response to the 100% oxygen breathing protocol similar to humans, involving both perfusion reduction / vasoconstriction and perfusion increase / vasodilation;
 - b. In this model, after the hindlimb ischemia procedure, the control limb responded consistently with a perfusion reduction, while the ischemic limb responded with an increase in perfusion;
 - c. Again, as in human, we were able to identify, in the LDF signal, six spectral bands compatible with the following activities - cardiac (5.3-4.6 Hz), respiratory (3.8-3.2 Hz), myogenic (0.17-0.059 Hz), sympathetic (0.052-0.020 Hz), endothelial NO-dependent (0.017-0.0094 Hz) and endothelial NO-independent (0.0084-0.0042 Hz);
 - d. To be a suitable model to study circulatory physiology and pathophysiology.
- (v) The Wavelet analysis is the best to understand how different determinants contributions compete to regulate microcirculation as part of the response to the perfusion changes experimentally developed. In both models, the flow reduction/ vasoconstrictor response related to hyperoxia seems to result from the activity decrease of all endothelial components.

Keywords: laser Doppler flowmetry, components analysis, wavelet transform (WT), detrended fluctuation analysis (DFA), multiscale entropy analysis (MSE)

Lista de abreviaturas e acrónimos

20-HETE – ácido 20-hidroxieicosatetraenóico

DAP – doença arterial periférica

DCF – densidade capilar funcional

DFA – análise de flutuação retificada (*detrended fluctuation analysis*)

DSPS – espectro da potência do desvio Doppler (*Doppler Shift Power Spectrum*)

FFT - transformada rápida de Fourier (*fast Fourier transform*)

HLI – isquémia do membro inferior (*hindlimb ischemia*)

IC – índice de complexidade

ITB – índice tornozelo-braço

LDF – fluxometria de laser Doppler (*laser Doppler flowmetry*)

LDI – imagem por laser Doppler (*laser Doppler imaging*)

L-NMMA - N^G-monometil-L-arginina

MRI – imagem por ressonância magnética (*magnetic resonance imaging*)

MSE – análise de entropia à multiescala (*multiscale entropy analysis*)

NO – monóxido de azoto

p_aO₂ – pressão parcial arterial de oxigénio

PTEA – perda transepidérmica de água

ROS – espécies reativas de oxigénio (*reactive oxygen species*)

tcpO₂ – pressão parcial transcutânea de oxigénio

UA – unidades arbitrárias

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*)

WT – transformada de ondeleta (*wavelet transform*)

Índice de Figuras

Figura 1. Comparação anatômica de artéria e veia, dispostas em corte transversal.

Figura 2. Representação esquemática do perfil parabólico de velocidade no fluxo sanguíneo laminar (à esquerda) e do fluxo sanguíneo turbulento (à direita).

Figura 3. Evolução da pressão, velocidade e área de secção ao longo dos diferentes tipos de vasos sanguíneos.

Figura 4. Árvore vascular arterial do membro inferior.

Figura 5. Árvore vascular arterial do pé.

Figura 6. Árvore vascular do membro posterior do murganho, com destaque para a coxa.

Figura 7. Árvore vascular arterial do membro inferior, com destaque para a perna e pata.

Figura 8. Esquema ilustrativo da arquitetura da microcirculação cutânea. O plexo inferior envia arteríolas para o superior que, por sua vez envia ansas capilares no sentido superior e vénulas para o plexo inferior.

Figura 9. Representação esquemática da pele do murganho (a) e do humano (b).

Figura 10. Esquema ilustrativo simplificado da emissão de um feixe fotónico que incide numa hemácia em movimento com uma determinada frequência (f_i), sendo refletida com uma outra frequência (f_r)

Figura 11. Esquema ilustrativo do trajeto da luz laser numa medição feita na pele por LDF.

Figura 12. Esquema ilustrativo da colocação da sonda de evaporimetria à superfície da pele (à esquerda); destaque da cabeça da sonda de evaporimetria (à direita).

Figura 13. Esquema ilustrativo das zonas de colocação das sondas à superfície do pé (1: sonda de PTEA; 2: sonda de LDF; 3: sonda de tcpO_2).

Figura 14. Ilustração da sonda de LDF utilizada para as medições em humanos (457 small angled probe, Perimed, Suécia).

Figura 15. Esquema ilustrativo da postura adotada no protocolo de elevação passiva da perna durante a fase de provocação.

Figura 16. Esquema ilustrativo da postura adotada no protocolo de oclusão supra-sistólica.

Figura 17. Esquema ilustrativo da postura adotada no protocolo de respiração de uma atmosfera saturada em oxigénio durante a fase de provocação.

Figura 18. Registo de um sinal de LDF ilustrativo pelo software *PeriSoft for Windows* ao longo dos 23 minutos do protocolo de oclusão supra-sistólica num indivíduo (#27, masculino, 23 anos), com destaque para os parâmetros de análise.

Figura 19. Registo ondulatório de um processo aleatório estatisticamente invariante à escala, representado em três escalas diferentes.

Figura 20. Escalograma do sinal artificial “seno” que representa a atividade de cada frequência fundamental (1 – 2 Hz, 2 – 0,6 Hz, 3 – 0,145 Hz, 4 – 0,052 Hz, 5 – 0,021 Hz, 6 – 0,0095 Hz, 7 – 0,0050 Hz) com 57600 amostras. A amplitude é dada visualmente pela intensidade cromática.

Figura 21. Representação tridimensional da amplitude do sinal artificial “seno” em função do período com e do número de amostras.

Figura 22. Periodograma do sinal artificial “seno”. Cada pico corresponde a uma frequência fundamental do sinal.

Figura 23. Relação exponencial entre os valores de período e frequência de um sinal.

Figura 24. Esquema ilustrativo do trajeto da luz laser numa medição à pele por LDI.

Figura 25. Face inferior do membro posterior do murganho, com destaque para as almofadas plantares.

Figura 26. Diagrama esquemático ilustrando os vasos principais do membro posterior do murganho (1 – artéria femoral, 2 – artéria femoral profunda, 3 – artéria epigástrica, 4 – músculo gastrocnémio).

Figura 27. Evolução dos valores médios (+ desvio padrão) de PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição no protocolo de elevação passiva da perna (N=65). A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a elevação dos 11 aos 20 minutos, e a recuperação entre os 21 e os 30 minutos.

Figura 28. Evolução dos valores médios (+ desvio padrão) da PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição nos grupos 1 (azul) e 2 (roxo) no protocolo de elevação passiva da perna. A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a elevação dos 11 aos 20 minutos, e a recuperação entre os 21 e os 30 minutos.

Figura 29. Evolução dos valores médios (+ desvio padrão) da PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição nos indivíduos de sexo feminino (vermelho) e masculino (azul). A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a elevação dos 11 aos 20 minutos, e a recuperação entre os 21 e os 30 minutos.

Figura 30. Evolução dos valores médios (+ desvio padrão) de PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição (N=65) no protocolo de oclusão supra-sistólica. A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a elevação dos 11 aos 20 minutos, e a recuperação entre os 21 e os 30 minutos.

Figura 31. Evolução dos valores médios (+ desvio padrão) da PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição nos grupos 1 (azul) e 2 (roxo) no protocolo de oclusão de supra-sistólica. A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a oclusão dos 11 aos 13 minutos, e a recuperação entre os 14 e os 23 minutos.

Figura 32. Evolução dos valores médios (+ desvio padrão) da PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição nos indivíduos de sexo feminino (traçado vermelho) e masculino (traçado azul) no protocolo de oclusão supra-sistólica. A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a oclusão dos 11 aos 13 minutos, e a recuperação entre os 14 e os 23 minutos.

Figura 33. Evolução dos valores médios (+ desvio padrão) de PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição (N=65) no protocolo de respiração de oxigénio a 100%. A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a respiração de oxigénio dos 11 aos 20 minutos, e a recuperação entre os 21 e os 30 minutos.

Figura 34. Evolução dos valores médios (+ desvio padrão) de PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição para os grupos 1 (traçado azul) e 2 (traçado roxo) no protocolo de respiração de oxigénio a 100%. A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a respiração de oxigénio dos 11 aos 20 minutos, e a recuperação entre os 21 e os 30 minutos.

Figura 35. Evolução dos valores médios (+ desvio padrão) de PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição para o sexo feminino (traçado vermelho) e masculino (traçado azul) no protocolo de respiração de oxigénio a 100%. A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a respiração de oxigénio dos 11 aos 20 minutos, e a recuperação entre os 21 e os 30 minutos.

Figura 36. Escalograma do sinal de LDF de um indivíduo representativo (#27, masculino, 23 anos) ao longo dos 30 minutos (1800 segundos, correspondendo a 57600 amostras) do protocolo de elevação passiva da perna.

Figura 37. Evolução da amplitude (expressa em unidades arbitrárias) de cada componente do sinal de LDF de um indivíduo representativo (#27, masculino, 23 anos) ao longo dos 30 minutos (1800 segundos, correspondendo a 57600 amostras) do protocolo de elevação passiva da perna.

Figura 38. Escalograma do sinal de LDF de um indivíduo representativo (#27, masculino, 23 anos) durante os 23 minutos (1380 segundos, correspondendo a 44160 amostras) do protocolo de oclusão supra-sistólica.

Figura 39. Evolução da amplitude (expressa em unidades arbitrárias) de cada componente do sinal de LDF de um indivíduo representativo (#27, masculino, 23 anos) ao longo dos 30 minutos (1800 segundos, correspondendo a 44160 amostras) do protocolo de oclusão supra-sistólica.

Figura 40. Escalograma do sinal de LDF de um indivíduo representativo (#27, masculino, 23 anos) durante os 30 minutos do protocolo de respiração de oxigénio a 100%.

Figura 41. Evolução da amplitude (expressa em unidades arbitrárias) de cada componente do sinal de LDF de um indivíduo representativo (#27, masculino, 23 anos) ao longo dos 30 minutos do protocolo de oxigénio a 100%.

Figura 42. Representação gráfica dos valores absolutos médios de fluxo sanguíneo (à esquerda) e dos rácios isquémia/controlo (à direita), avaliados por LDI e por LDF.

Figura 43. Fluxo sanguíneo das patas controlo (direita) e isquémica (esquerda), medido por LDI, no dia 0 (dia anterior à cirurgia) e nos dias 4, 6, 9, 12, 15, 21 e 35 (em cima). O fluxo sanguíneo é dado pela intensidade cromática e expresso em UA (em baixo).

Figura 44. Valores médios (azul – fase estabilização; vermelho – fase provocação; verde – fase recuperação) da amplitude de cada componente do sinal de LDF nos diferentes dias de medição no membro controlo (esquerda) e isquémico (direita).

Figura 45. Evolução do fluxo sanguíneo médio nos membros controlo (traçado azul) e isquémico (traçado vermelho) ao longo do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos diferentes dias de análise.

Figura 46. Evolução do fluxo sanguíneo, medido por LDI (em cima), por LDF (ao centro), ao longo do período de acompanhamento dos murganhos. Evolução do rácio do fluxo sanguíneo entre os membros isquémico e controlo por LDI e LDF (em baixo), ao longo do período de acompanhamento dos murganhos.

Figura 47. Representação tridimensional da amplitude do sinal de LDF de um murganho representativo (#2, pata esquerda, 27 semanas) ao durante o protocolo de respiração de oxigénio a 100%.

Figura 48. Periodograma do sinal de LDF de um murganho representativo (#2, pata esquerda, 27 semanas) ao durante o protocolo de respiração de oxigénio a 100%.

Figura 49. Região 0-7 Hz dos espetros (semilogarítmica) do sinal de LDF de um murganho representativo (pata esquerda) obtido por FFT (em cima) e por WT (em baixo).

Figura 50. Região 0-7 Hz dos espetros do sinal de LDF de um murganho representativo (pata esquerda) obtido por FFT (em cima) e por WT (em baixo).

Figura 51. Escalograma do sinal de LDF de um murganho representativo (#2, pata esquerda, 27 semanas) durante o protocolo de respiração de oxigénio a 100%.

Figura 52. Evolução da amplitude de cada componente do sinal de LDF de um murganho representativo (#2, pata esquerda, 27 semanas) durante o protocolo de respiração de oxigénio a 100%.

Figura 53. Evolução do rácio de amplitude da WT das componentes miogénica, simpática, endotelial dependente de NO e endotelial independente de NO nas fases de estabilização (azul), provocação (vermelho) e recuperação (verde).

Figura 54. Evolução do expoente alfa das componentes miogénica, simpática, endotelial dependente de NO e endotelial independente de NO nas fases de estabilização (azul), provocação (vermelho) e recuperação (verde).

Figura 55. Evolução do índice de complexidade das componentes miogénica, simpática, endotelial dependente de NO e endotelial independente de NO nas fases de estabilização (azul), provocação (vermelho) e recuperação (verde).

Índice de Tabelas

Tabela 1. Critérios de inclusão e não-inclusão definidos para o estudo.

Tabela 2. Caracterização demográfica e antropométrica da amostra estudada.

Tabela 3. Lista de parâmetros, calculados a partir do sinal de LDF, usados para a caracterização das respostas aos protocolos de elevação passiva da perna e de oclusão supra-sistólica.

Tabela 4. Lista de parâmetros, calculados a partir do sinal de tcpO_2 , usados para a caracterização das respostas aos protocolos de elevação passiva da perna e de oclusão supra-sistólica.

Tabela 5. Correspondência entre os valores de período e frequência fundamentais do sinal artificial “seno”.

Tabela 6. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de elevação passiva da perna (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para todos os indivíduos. Comparação estatística com a fase I ($p < 0,05$, * - estatisticamente significativo).

Tabela 7. Coeficiente Rho da correlação de Spearman entre parâmetros do protocolo de elevação passiva da perna ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 8. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) da pressão arterial sistólica (PS) e diastólica (PD), medidas no braço e tornozelo, e de ITB, nos indivíduos dos grupos 1 e 2 ($N=65$). Comparação estatística entre grupos ($p < 0,05$).

Tabela 9. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de elevação passiva da perna (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para os indivíduos dos grupos 1 e 2. Comparação estatística entre grupos ($p < 0,05$, * - estatisticamente significativo).

Tabela 10. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de elevação passiva da perna (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para os indivíduos do sexo feminino e masculino. Comparação estatística entre sexos ($p < 0,05$, * - estatisticamente significativo).

Tabela 11. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de oclusão supra-sistólica (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para todos os indivíduos. Comparação estatística com a fase I ($p < 0,05$, * - estatisticamente significativo).

Tabela 12. Coeficiente Rho da correlação de Spearman entre parâmetros do protocolo de oclusão supra-sistólica ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 13. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de oclusão supra-sistólica (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para os indivíduos dos grupos 1 e 2. Comparação estatística entre grupos ($p < 0,05$, * - estatisticamente significativo).

Tabela 14. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de oclusão supra-sistólica (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para os indivíduos do sexo feminino e masculino. Comparação estatística entre sexos ($p < 0,05$, * - estatisticamente significativo).

Tabela 15. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de respiração de oxigênio a 100% (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para todos os indivíduos. Comparação estatística com a fase I ($p < 0,05$, * - estatisticamente significativo).

Tabela 16. Coeficiente Rho da correlação de Spearman entre parâmetros do protocolo de respiração de oxigênio ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 17. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de respiração de oxigênio a 100% (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para os indivíduos dos grupos 1 e 2. Comparação estatística entre grupos ($p < 0,05$, * - estatisticamente significativo).

Tabela 18. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de respiração de oxigênio a 100% (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para os indivíduos do sexo feminino e masculino. Comparação estatística entre sexos ($p < 0,05$, * - estatisticamente significativo).

Tabela 19. Coeficiente Rho da correlação de Spearman entre as variações percentuais do fluxo sanguíneo e da PTE para os três protocolos experimentais ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 20. Média e desvio-padrão (dp) do rácio de amplitude das diferentes componentes do sinal de LDF (N=65). Comparação com a fase de estabilização ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 21. Média e desvio-padrão (dp) da amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de elevação da perna entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 22. Média e desvio-padrão (dp) da amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de elevação da perna entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os sexos feminino e masculino para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 23. Média e desvio-padrão (dp) do rácio de amplitude das diferentes componentes do sinal de LDF (N=65). Comparação com a fase de estabilização ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativa).

Tabela 24. Média e desvio-padrão (dp) (dp) do rácio da amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de oclusão supra-sistólica entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 25. Média e desvio-padrão (dp) do rácio de amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de oclusão supra-sistólica entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os sexos feminino e masculino para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 26. Média e desvio-padrão (dp) do rácio de amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% (N=65). Comparação estatística com a fase de estabilização ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 27. Média \pm desvio-padrão do rácio de amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% para os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 28. Média \pm desvio-padrão do rácio de amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% para os sexos feminino e masculino. Comparação entre os sexos para cada fase ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 29. Média \pm desvio-padrão do rácio de amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% para os indivíduos que responderam com diminuição do sinal de LDF (N=50). Comparação entre os sexos para cada fase ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 30. Média \pm desvio-padrão do rácio de amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% para os indivíduos que responderam com aumento do sinal de LDF (N=15). Comparação entre os sexos para cada fase ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 31. Média \pm desvio-padrão do rácio de amplitude de cada componente do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% para os indivíduos que responderam com vasoconstrição (N=50) e com vasodilatação (N=15). Comparação entre respostas para cada fase ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 32. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e das suas componentes nas três fases do protocolo de elevação passiva da perna. Comparação com a fase de estabilização ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 33. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de elevação da perna entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 34. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de elevação da perna entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os sexos feminino e masculino para cada fase ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 35. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e das suas componentes nas três fases do protocolo de oclusão supra-sistólica. Comparação com a fase de estabilização ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 36. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de oclusão supra-sistólica entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 37. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de oclusão supra-sistólica entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os sexos feminino e masculino para cada fase ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 38. Média e desvio-padrão (dp) dos expoentes alfa do sinal de LDF e das respectivas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigênio a 100%. Comparação estatística com a fase de estabilização ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 39. Média \pm desvio-padrão do expoente alfa do sinal de LDF e respectivas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigênio a 100% para os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 40. Média \pm desvio-padrão do expoente alfa do sinal de LDF e respectivas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigênio a 100% para os sexos feminino e masculino. Comparação entre os sexos para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 41. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e das suas componentes nas três fases do protocolo de elevação da perna. Comparação com a fase de estabilização ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 42. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de elevação da perna entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 43. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de elevação da perna entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 44. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e das suas componentes nas três fases do protocolo de oclusão supra-sistólica. Comparação com a fase de estabilização ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 45. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de oclusão supra-sistólica entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 46. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de oclusão supra-sistólica entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 47. Média e desvio-padrão (dp) dos índices de complexidade das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigênio a 100%. Comparação estatística com a fase de estabilização ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 48. Média \pm desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e respectivas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigênio a 100% para os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 49. Média \pm desvio-padrão (dp) do Índice de complexidade do sinal de LDF e respectivas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigênio a 100% para os sexos feminino e masculino. Comparação entre os sexos para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Figura 41. Fluxo sanguíneo das patas controle (direita) e isquêmica (esquerda), medido por LDI, no dia 0 (dia anterior à cirurgia) e nos dias 4, 6, 9, 12, 15, 21 e 35 (em cima). O fluxo sanguíneo (UA) é

dado pela intensidade cromática (em baixo). A área de medição foi de 4.9cm×3.3cm, a velocidade de varrimento foi de 10ms/píxel.

Tabela 50. Média \pm desvio-padrão do fluxo sanguíneo medido por LDF nos dois membros dos murganhos (N=16) nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100%. Comparação estatística com a fase de estabilização e entre membros, para cada fase ($p<0,005$, NA – não aplicável).

Tabela 51. Contabilização, em termos absolutos e percentuais, do número de registos de LDF em cada tipo de classificação das respostas vasculares dos animais à provocação com 100% oxigénio, para um total de 16 animais (32 membros posteriores) analisados.

Tabela 52. Evolução do fluxo sanguíneo medido por LDF ao longo do período de acompanhamento. Comparação estatística entre a fase I de cada dia de medição com a fase I do dia 0. Comparação estatística das fases II e III com a fase I em cada dia de medição ($p<0,05$).

Tabela 53. Limites médios (em Hertz) esquerdo e direito das bandas detetadas no periodograma de ondeleta em ambas as patas dos murganhos, N=16).

Tabela 54. Limites (em Hertz) das bandas detetadas no frequenciograma de Fourier em ambas as patas dos murganhos, N=16).

Tabela 55. Média e desvio-padrão (dp) do rácio componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% (N=32).

Tabela 56. Média e desvio-padrão (dp) das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos membros que responderam com diminuição do sinal de LDF ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 57. Média e desvio-padrão (dp) das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos membros que responderam com aumento do sinal de LDF ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 58. Evolução dos rácios médio (+ desvio-padrão) das componentes miogénica, simpática e endoteliais do sinal de LDF do membro isquémico ao longo dos vários dias de observação.

Tabela 59. Evolução dos rácios médio (+ desvio-padrão) das componentes miogénica, simpática e endoteliais do sinal de LDF do membro controlo ao longo dos vários dias de observação.

Tabela 60. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% (N=32).

Tabela 61. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos membros que responderam com diminuição do sinal de LDF (N=16, ambos os membros).

Tabela 62. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos membros que responderam com aumento do sinal de LDF (N=16, ambos os membros).

Tabela 63. Expoente alfa das componentes miogénica, simpática, endotelial dependente de NO e endotelial independente de NO para o membro isquémico nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos diferentes dias de análise ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 64. Expoente alfa das componentes miogénica, simpática, endotelial dependente de NO e endotelial independente de NO para o membro controlo nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos diferentes dias de análise ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 65. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% (N=16, ambos os membros).

Tabela 66. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos membros que responderam com diminuição do sinal de LDF (N=16, ambos os membros).

Tabela 67. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos membros que responderam com aumento do sinal de LDF (N=16, ambos os membros).

Tabela 68. Índice de complexidade das componentes miogénica, simpática, endotelial dependente de NO e endotelial independente de NO para o membro isquémico nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos diferentes dias de análise ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Tabela 69. Índice de complexidade das componentes miogénica, simpática, endotelial dependente de NO e endotelial independente de NO para o membro controlo nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos diferentes dias de análise ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Capítulo I : Introdução

O Sistema Cardiovascular é um sistema fechado composto pelo coração e por vasos sanguíneos, sendo responsável pela distribuição e recolha de sangue em todos os órgãos do organismo. O coração funciona como uma “bomba” hidráulica que impulsiona o sangue, enquanto que os vasos sanguíneos funcionam como estruturas de condução do sangue e de trocas de matéria e energia entre este e os tecidos. O Sistema Linfático é outro componente, constituído pelos vasos linfáticos e gânglios, responsáveis pela drenagem parcial do fluido intersticial para o sistema cardiovascular, com funções imunitárias. O comportamento do sangue ao longo do seu trajeto no interior dos vasos sanguíneos é estudado pela Hemodinâmica.

1.1. Função vascular⁽¹⁾

Existem cinco tipos de vasos sanguíneos, que se distinguem com base na estrutura da sua parede e na sua função. São eles as artérias, as arteríolas, os capilares, as vénulas e as veias. As artérias asseguram o transporte de sangue das câmaras ventriculares cardíacas para os órgãos, e as veias dos órgãos de volta para as câmaras auriculares cardíacas. As arteríolas, capilares e vénulas constituem os vasos mais pequenos do organismo, coletivamente designados por microcirculação, e encontrados no interior dos próprios órgãos, garantindo a sua nutrição.

Quanto à estrutura, todos os vasos à exceção dos capilares são constituídos por três camadas ou túnicas – íntima, média e adventícia, representadas na figura 1. A túnica íntima, a mais interna, é composta por uma camada de células epiteliais em permanente contacto com o sangue, chamada endotélio. A túnica média é composta por uma camada de músculo liso disposto circularmente, rodeada por uma camada de tecido conjuntivo elástico, rico em fibras de elastina. O músculo liso contrai e relaxa, permitindo a alteração do calibre do vaso, e o tecido elástico permite ao vaso esticar e regressar à posição inicial. A túnica adventícia é

composta por uma camada de tecido conjuntivo rico em colagénio, que protege o vaso sanguíneo e o ancora a estruturas adjacentes. A espessura destas camadas varia entre os diferentes tipos de vasos.

As artérias podem classificar-se quanto à estrutura em dois tipos – elásticas e musculares. As artérias elásticas consistem essencialmente na artéria aorta e suas ramificações. A sua túnica média é maioritariamente rica em elastina, permitindo-lhes expandir quando recebem sangue com alta pressão vindo do ventrículo esquerdo, bem como regressar à sua posição inicial. As artérias musculares surgem na árvore arterial no seguimento das artérias elásticas e apresentam uma túnica média rica em músculo liso, que lhes permite alterar ativamente o seu calibre. Nestas artérias a pressão sanguínea começa a diminuir.

As arteríolas são as artérias mais pequenas de todas, e responsáveis pela entrega de sangue a áreas localizadas de tecido e pela regulação dessa taxa de entrega. É nelas que se verifica uma queda mais acentuada na pressão sanguínea, ou seja, são elas as principais responsáveis pela resistência vascular periférica. As arteríolas de maior calibre apresentam várias camadas de músculo liso, enquanto que as de menor calibre apresentam apenas uma camada. As células musculares lisas e as células endoteliais apresentam junções comunicantes (*gap junctions*) para comunicação célula-célula. As células musculares são ricamente innervadas por fibras pós-ganglionares do sistema nervoso simpático, que regulam o seu grau de contração e, portanto, o seu calibre.

Já os capilares são apenas constituídos pela túnica íntima, sendo esta composta pela camada endotelial, que se apoia numa membrana basal rica em tecido conjuntivo, onde se encontram também células pouco diferenciadas chamadas pericitos. O diâmetro dos capilares é reduzido na extremidade arteriolar, sendo menor que o diâmetro das próprias hemácias, e aumentando no sentido da extremidade venular. Na sua maioria, os capilares são desprovidos de contratilidade.

Da coalescência de vários capilares nascem as primeiras vénulas, chamadas vénulas pós-capilares. A sua parede tem uma constituição muito semelhante à da parede dos capilares, sendo desprovidas de músculo liso. A camada muscular surge e aumenta de espessura à medida que o calibre das vénulas aumenta. A túnica íntima das vénulas

proximais apresenta-se rodeada por alguns fibroblastos, mas as vénulas mais distais, de maior calibre, possuem já túnica média e uma fina túnica adventícia. Várias vénulas unem-se para formar veias, constituídas pelas três camadas tecidulares, sendo a adventícia a mais espessa. Finalmente, as veias apresentam calibres superiores aos das artérias e, ao contrário destas, apresentam válvulas que asseguram o fluxo unidirecional de sangue dos tecidos para a aurícula direita.

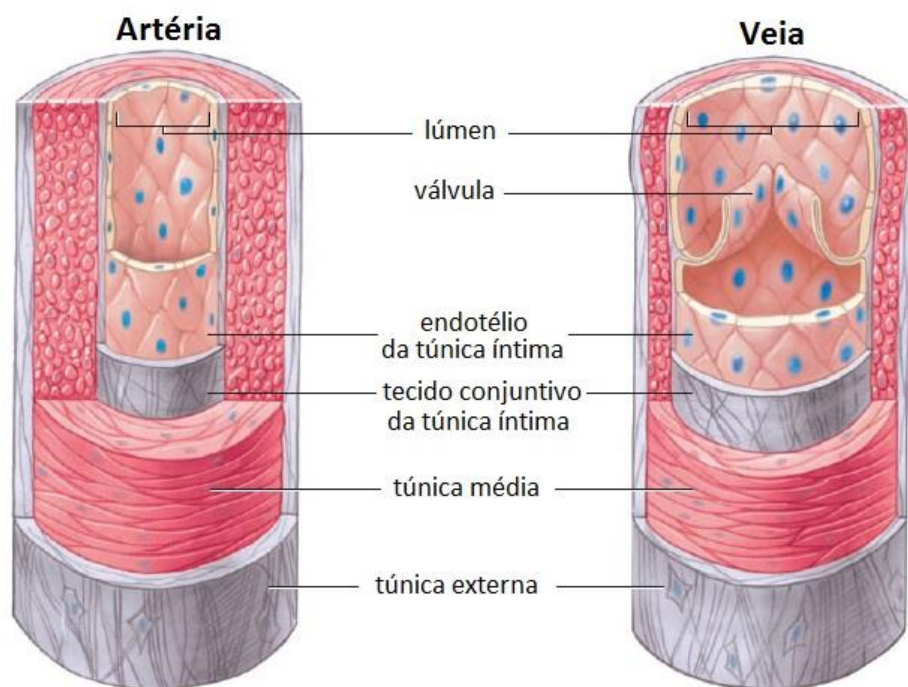


Figura 1. Comparação anatômica de artéria e veia, dispostas em corte transversal (adaptado de Shier *et al.*, 2006⁽²⁾).

1.1.1 Princípios físicos da circulação sanguínea⁽³⁾

Por forma a poder circular no interior do Sistema Cardiovascular, o sangue é movido por gradientes de pressão, ou seja, por diferenças de pressão entre dois pontos do seu trajeto, sendo que o sangue se desloca sempre de um ponto de maior pressão para um ponto de menor pressão. No entanto, o movimento do sangue ao longo de qualquer estrutura é sempre contrariado pela resistência oferecida pela própria estrutura e pelas

interações da mesma com o sangue. A relação entre qualquer gradiente de pressão entre dois pontos 1 e 2 e a resistência ao movimento do sangue é dada pela lei de Ohm:

$$Q = \frac{P_2 - P_1}{R} \quad [1]$$

onde Q representa o fluxo sanguíneo, R a resistência, e P_1 e P_2 as pressões nos pontos 1 e 2, como por exemplo nas duas extremidades de um vaso sanguíneo ou entre uma câmara cardíaca e um vaso sanguíneo. Esta lei pode ser aplicada quer a vasos sanguíneos individuais quer a redes de vasos.

Por sua vez, o fluxo sanguíneo influencia a própria velocidade de circulação. A relação entre estas variáveis representa-se por:

$$v = \frac{Q}{A} \quad [2]$$

onde v representa a velocidade e A a área de secção transversal de um vaso sanguíneo. Existe, portanto, uma relação de proporcionalidade direta entre fluxo e velocidade. Caso se considere o fluxo sanguíneo a um órgão individual, a equação 1 passa a ter a seguinte forma:

$$Q_{\text{órgão}} = \frac{P_A - P_V}{R} \quad [3]$$

onde P_A representa a pressão arterial e P_V a pressão venosa desse órgão. Constata-se, portanto, que o fluxo sanguíneo é diretamente proporcional ao gradiente de pressão e inversamente proporcional à resistência. Por sua vez, a magnitude da resistência ao movimento do sangue depende de fatores relacionados com o próprio sangue bem como o vaso sanguíneo, como mostra a lei de Poiseuille-Hagen:

$$R = \frac{8\eta L}{\pi r^4} \quad [4]$$

onde R representa a resistência, η a viscosidade do sangue, L o comprimento do vaso sanguíneo e r o raio do mesmo. A resistência ao movimento do sangue é, então, diretamente proporcional à viscosidade do mesmo e ao comprimento do vaso sanguíneo onde circula, mas inversamente proporcional à quarta potência do raio do vaso.

A lei de Poiseuille-Hagen depende de várias suposições – o vaso sanguíneo assume-se ser uniforme com uma área de secção circular; o fluxo é estável (invariável no tempo) e laminar (no qual o fluido se desloca em camadas, sempre com a mesma direcção); o sangue assume-se comportar como um fluido Newtoniano, isto é, com uma viscosidade fixa. Na prática, estas condições são raramente satisfeitas no sistema cardiovascular – a área de secção dos vasos não é circular, o fluxo é variável no tempo e turbulento em determinadas zonas da árvore vascular e, por fim, o sangue comporta-se como um fluido não Newtoniano. Ainda assim, esta lei é uma aproximação útil à influência dos determinantes da resistência. Substituindo a variável R da equação 3 pela equação 4 obtém-se:

$$Q = \frac{(P_A - P_V)\pi r^4}{8\eta L} \quad [5]$$

A equação 5 representa, então, os determinantes *major* da perfusão de um órgão. A modificação do raio dos vasos sanguíneos é o mecanismo fisiológico utilizado para modificar o fluxo a um órgão sem modificar as pressões arterial e venosa, uma vez que devem ser mantidas em intervalos estreitos. Da equação 5 decorre então que a vasodilatação aumenta a perfusão de um órgão enquanto que a vasoconstrição a diminui.

Quando se considera a movimentação de sangue ao longo de um conjunto de vasos sanguíneos há que ter em conta o arranjo anatómico dos mesmos. Existem dois tipos essenciais de arranjos vasculares – em série e em paralelo. O arranjo em série consiste na disposição longitudinal dos vasos sanguíneos uns em seguimento dos outros. Este tipo de arranjo é encontrado na macrocirculação e maioritariamente fora dos órgãos. Neste caso, a resistência total do arranjo anatómico é dada pela equação:

$$R_t = R_1 + R_2 + \dots + R_n \quad [6]$$

O arranjo em paralelo consiste na disposição paralela de vários ramos de um mesmo vaso sanguíneo. Este tipo de arranjo vascular é encontrado sobretudo nos vasos da microcirculação e, portanto, no interior dos órgãos. Neste caso, a resistência total do arranjo é dada pela equação:

$$\frac{1}{R_t} = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} + \dots + \frac{1}{R_n} \quad [7]$$

O fluxo sanguíneo dentro de um vaso sanguíneo pode apresentar dois tipos de comportamento – laminar ou turbulento, ilustrados na figura 2. No fluxo laminar o fluido desloca-se em diferentes camadas, paralelas ao eixo do vaso, e sempre na mesma direção, mas com diferentes velocidades. Estas camadas deslizam umas sobre as outras, havendo pouca mistura de sangue entre camadas. O perfil de velocidade ao longo da secção transversal de um vaso sanguíneo é parabólico, sendo a velocidade descrita em função do raio pela equação:

$$V_r = \frac{(P_A - P_V)(r_i^2 - r^2)}{4\eta L} = V_{max} \left(\frac{1 - r^2}{r_i^2} \right) \quad [8]$$

onde v_r representa a velocidade a um determinado raio r , r_i representa a distância de uma camada de sangue ao centro do vaso, e v_{max} a velocidade máxima. Na parede do vaso ($r = r_i$) a velocidade assume-se ser zero, enquanto que no centro do vaso ($r=0$) ela é máxima (v_{max}), e dada por:

$$V_{max} = \frac{(P_A - P_V)r_i^2}{4\eta L} \quad [9]$$

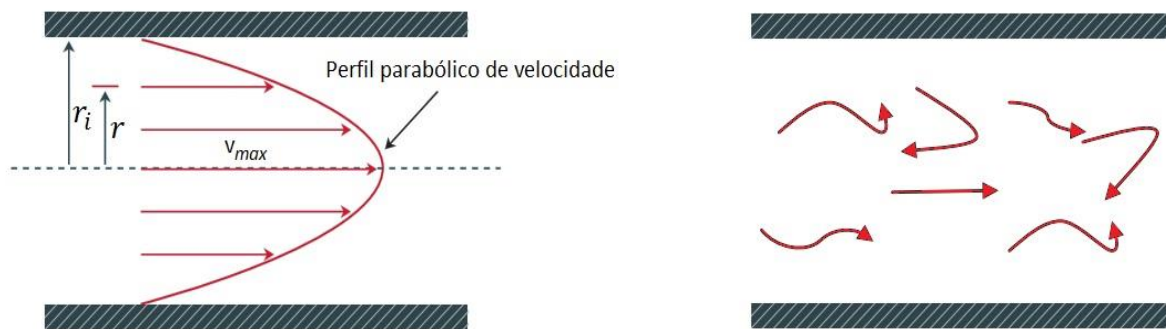


Figura 2. Representação esquemática do perfil parabólico de velocidade no fluxo sanguíneo laminar (à esquerda) e do fluxo sanguíneo turbulento (à direita) (adaptado de Westerhof *et al.*, 2010⁽³⁾).

Já no fluxo turbulento as velocidades e pressões locais no interior dos vasos sanguíneos flutuam aleatoriamente. A determinação do tipo de fluxo é feita por um parâmetro chamado número de Reynolds (R_e), definido como:

$$R_e = \frac{\rho v d}{\eta} \quad [10]$$

onde ρ representa a densidade do sangue, v a velocidade média, e d o diâmetro do vaso sanguíneo. O número de Reynolds é adimensional e reflete o rácio da inércia e dos efeitos viscosos. Para baixos números de R_e (<2200) os efeitos viscosos são dominantes e o fluxo laminar prevalece, enquanto que para números de R_e superiores a 2200 o fluxo é turbulento.

A força que impulsiona o sangue ao longo de um vaso é equilibrada pela tensão resultante do cisalhamento (atrito) gerada pelo gradiente de velocidade na parede do vaso. À luz da lei de Poiseuille a tensão de cisalhamento τ é dada pela equação:

$$\tau = \frac{r(P_2 - P_1)}{2L} \quad [11]$$

Substituindo a variável Q pela equação 5, passamos a ter:

$$\tau = \frac{4\eta Q}{\pi r^3} \quad [12]$$

O sangue apresenta, como referido acima, propriedades não Newtonianas, sendo já conhecidas duas causas principais para este comportamento⁽⁴⁾. A tensões de cisalhamento muito baixas, as hemácias agregam-se e aumentam a resistência viscosa ao fluxo. À medida que a tensão de cisalhamento aumenta, estes agregados quebram-se e a viscosidade diminui. A tensões ainda superiores, as hemácias sofrem maior deformação pelo fluxo resultando numa maior diminuição da viscosidade. A viscosidade apresenta ainda uma forte dependência do hematócrito, aumentando de forma não-linear quando aquele aumenta.

1.1.2. Circulação periférica

Os ventrículos ejetam pequenas quantidades de sangue para artérias elásticas, preparadas para receber sangue com uma pressão muito elevada. À medida que o sangue é transportado destas artérias elásticas para as artérias musculares, a espessura da camada

elástica da sua parede diminui, perdendo elasticidade⁽⁵⁾. Ao longo de todo o trajeto arterial, o fluxo sanguíneo apresenta um perfil pulsátil, ou seja, o sangue é conduzido em pequenos volumes de sangue chamados “pulsos”. Apresenta também um perfil laminar, à exceção das zonas de ramificação, onde se torna turbulento. A pulsatilidade do fluxo arterial é explicada pela atividade de bomba cardíaca, sendo que cada pulso individual de sangue é explicado por uma ejeção cardíaca. Devido a este carácter oscilatório da pressão arterial, o registo dos valores máximo e mínimo de pressão, a que se dá os nomes de pressão arterial sistólica e diastólica, respetivamente, é imprescindível para a avaliação do estado geral de saúde e, em particular, da função do sistema cardiovascular^(5, 6).

Uma vez nas arteríolas e até alcançar os capilares, a pressão sanguínea diminui gradualmente até ser praticamente nula. É essencial que a pressão sanguínea diminua para que o sangue não alcance os capilares com uma pressão suficientemente elevada para provocar o seu rebentamento. A resistência criada pelas arteríolas ao fluxo de sangue torna-se então extremamente importante para permitir trocas adequadas de matéria com os tecidos, isto é, para que estes processos ocorram a pressões e velocidades adequadas. De facto, as arteríolas são os vasos que mais contribuem para a resistência vascular periférica. São vasos unicamente adequados para a regulação do fluxo aos capilares uma vez que o seu diâmetro pode sofrer grandes alterações percentuais de diâmetro, alterações essas superiores às de qualquer outro segmento da vasculatura. Esta propriedade está intimamente associada à sua capacidade de responder a estímulos tanto físicos como químicos. Os estímulos físicos são, essencialmente, variações da pressão intraluminal, enquanto os estímulos químicos dizem respeito a mediadores produzidos pelas próprias túnicas vasculares, pelo parênquima e estroma dos órgãos, e até aos próprios gases dissolvidos.

Devido à sua elevada área de secção, a velocidade de fluxo nos capilares é a mais baixa do sistema cardiovascular, o que permite trocas mais completas de substâncias entre o plasma e o interstício tecidular. Estas trocas ocorrem por três processos – difusão, escoamento integrado, e pinocitose. A maior parte deste plasma consegue regressar aos capilares, sendo a restante absorvida pelos capilares linfáticos, formando o líquido chamado linfa⁽⁹⁾. Depois de realizadas estas trocas o sangue passa para as vénulas e, de seguida, para as veias, que o fazem retornar ao coração. As vénulas são também importantes para a troca

de substâncias com os tecidos, para a resistência vascular pós-capilar e para a defesa imunológica.

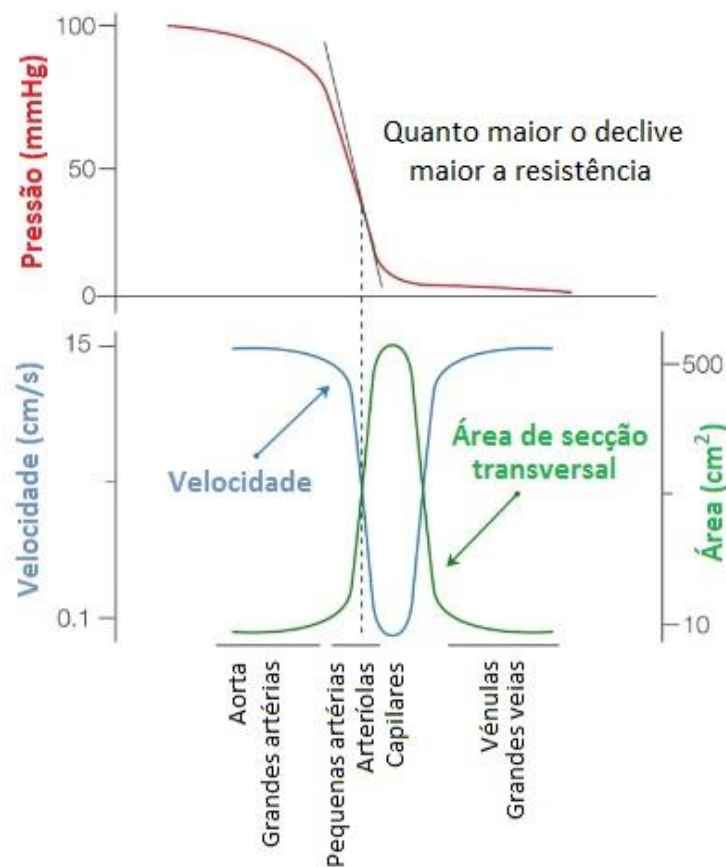


Figura 3. Evolução da pressão, velocidade e área de secção ao longo dos diferentes tipos de vasos sanguíneos (adaptado de Berne *et al.*, 2008⁽⁵⁾).

1.1.3. A microcirculação

O conceito de microcirculação evoluiu ao longo dos anos. A primeira definição era de carácter anatómico, segundo a qual a microcirculação compreendia os vasos sanguíneos com diâmetro inferior a 150 μm , isto é, arteríolas, capilares e vénulas. Mais tarde surgiu uma nova definição, desta vez de carácter funcional, que incluía na microcirculação também vasos de maior diâmetro que apresentassem atividade miogénica⁽⁷⁾.

A rede microcirculatória de qualquer órgão apresenta várias funções:

- nutrição das células e remoção dos produtos de metabolismo⁽⁸⁾ através dos processos de difusão, escoamento integrado e pinocitose;
- contribuição para a resistência arterial periférica⁽⁷⁾.

Os três processos de movimentação de nutrientes do interior dos capilares para o fluido intersticial obedecem a princípios físicos distintos. A difusão refere-se à troca de substâncias entre sangue e interstício por meio dos espaços intercelulares do endotélio, troca esta que é explicada pela lei de Fick⁽⁵⁾:

$$X_{tc} = Q[X]_a - Q[X]_v \quad [13]$$

onde X_{tc} representa o efluxo transcapilar de uma substância X , Q o fluxo sanguíneo, e $[x]_a$ e $[X]_v$ as concentrações arterial e venosa da substância X , respectivamente. Segundo esta lei, a subtração entre a quantidade de uma substância que entra num órgão num dado período de tempo pela quantidade que sai deve ser igual à taxa de utilização da substância pelo órgão. O processo de difusão é dependente de quatro fatores – a área de superfície; a distância de difusão; a permeabilidade da membrana de difusão; e a diferença de concentração da substância entre os dois compartimentos entre os quais a substância se difunde.

O processo de escoamento integrado faz-se através de canais aquosos que atravessam as próprias células endoteliais, entre o sangue e o interstício tecidual. A movimentação de fluido do sangue para o interstício denomina-se filtração, enquanto que aquela que ocorre do interstício para o sangue se denomina reabsorção. O processo de filtração é influenciado pelas pressões hidrostáticas e osmóticas quer do sangue quer do interstício, como dita a lei de Starling da filtração, expressa pela equação seguinte:

$$J = K_f[(P_c - P_i) - \sigma(\pi_c - \pi_i)] \quad [14]$$

onde J representa a taxa de movimentação de fluido entre os dois meios, K_f o coeficiente de filtração (relacionado com a condutividade da água e com a área de filtração), P_c e P_i as pressões hidrostáticas capilar e intersticial, respectivamente, σ o coeficiente de reflexão (medida da permeabilidade endotelial), e π_c e π_i as pressões osmóticas capilar e intersticial,

respetivamente. Finalmente, o transporte por pinocitose é um tipo de transporte vesicular utilizado para o transporte de proteínas e lípidos⁽¹⁰⁾.

Todos os vasos sanguíneos apresentam um determinado grau de contração basal, que influencia, segundo a lei de Poiseuille-Hagen, a resistência ao fluxo sanguíneo e, portanto, o valor do próprio fluxo sanguíneo numa região de um órgão a cada momento. A esse grau de contração basal dá-se o nome de tónus vascular, sendo como que uma expressão do nível de ativação da parede vascular, e que se pensa ser iniciado pelo próprio valor elevado da pressão arterial⁽¹¹⁾. Este grau basal de contração pode ser alterado pela ação de estímulos vasoativos, isto é, aumentado por vasoconstritores e diminuído por vasodilatadores, respetivamente. Os principais estímulos vasoativos são as hormonas circulantes, os neurotransmissores libertados por terminações nervosas sensoriais e autonómicas e os mediadores locais, nomeadamente substâncias produzidas pelas células endoteliais, musculares lisas ou intersticiais⁽¹²⁾.

Os principais determinantes da perfusão capilar são o fluxo sanguíneo capilar propriamente dito e a patência capilar⁽¹³⁾. O fluxo sanguíneo capilar é um produto do gradiente de pressão, do tónus arteriolar e da hemorreologia. O fluxo num único capilar não é um bom indicador do fornecimento de oxigénio aos tecidos devido à sua heterogeneidade espacial e temporal^(14, 15). A patência capilar é dada pela densidade capilar funcional (DCF), definida como o número de capilares funcionais, isto é, preenchidos por hemácias em movimento, por unidade de área. O fluxo sanguíneo microcirculatório apresenta oscilações em termos de magnitude, explicadas pela atuação a cada momento de vários sistemas de regulação, quer intrínsecos ao próprio tecido/órgão quer extrínsecos ao mesmo⁽¹⁶⁾, sendo que ambos estes mecanismos se influenciam mutuamente de forma complexa, embora ainda mal percebida⁽¹⁷⁾.

1.1.3.1. Regulação de curta duração da perfusão

A regulação extrínseca da perfusão é levada a cabo, sobretudo, por neurónios pós-ganglionares do sistema nervoso autónomo. De um modo geral, as fibras simpáticas provocam vasoconstrição por ativação dos recetores alfa adrenérgicos. Há, no entanto,

exceções – a primeira é a vasculatura do miocárdio e do músculo esquelético, onde as fibras simpáticas provocam vasodilatação atuando sobre recetores adrenérgicos β_2 ; a segunda é a própria pele, cuja perfusão é regulada por dois subsistemas de fibras simpáticas – fibras noradrenérgicas e fibras colinérgicas. As fibras noradrenérgicas libertam noradrenalina, que atua em recetores adrenérgicos α_1 e α_2 (estes últimos sobretudo em artérias e veias) provocando vasoconstrição⁽¹⁹⁻²¹⁾. As fibras colinérgicas libertam acetilcolina e co-transmissores, provocando vasodilatação. Ainda não se sabe definitivamente quais os co-transmissores libertados, existindo estudos que propõem o péptido intestinal vasoativo (VIP)⁽⁸⁵⁾, a substância P⁽⁸⁶⁾, a histamina⁽⁸⁷⁾ e prostanóides vasodilatadores⁽⁸⁸⁾.

Outros neurónios (não autonómicos) provocam vasodilatação através da libertação de substância P, e de péptido relacionado com o gene da calcitonina (*calcitonin gene-related peptide* - CGRP)⁽¹⁸⁾.

Enquanto os capilares se especializam na troca de substâncias com o fluido intersticial, as arteríolas são os vasos responsáveis pela regulação intrínseca da perfusão a cada momento. Podem fazê-lo por meio de duas atividades principais – atividade miogénica e atividade endotelial, ou seja, através da ação do seu músculo liso ou do seu endotélio, respetivamente⁽²²⁾.

Em alguns vasos sanguíneos, o tónus vascular apresenta oscilações ao longo do tempo, dizendo-se possuir atividade miogénica ou vasomotricidade. Esta atividade consiste na oscilação rítmica do calibre dos vasos sanguíneos, ou seja, numa sequência rítmica de contrações e dilatações que, como tal, confere um carácter oscilatório ao próprio tónus vascular. Estas oscilações não são estritamente periódicas mas também não são aleatórias⁽²³⁾. Está descrita sobretudo em arteríolas mas foi já identificada em artérias, veias, vénulas e vasos linfáticos⁽²⁴⁾, e sabe-se existir uma relação inversa entre esta atividade e o comprimento do vaso, dentro da mesma rede vascular, sendo a circulação cerebral uma exceção⁽²⁴⁾. A vasomotricidade é encontrada tanto em vasos isolados como em organismos inteiros⁽²⁵⁾, sendo a sua magnitude variável entre órgãos⁽²⁶⁾. Apesar de ser um fenómeno intrínseco do músculo liso vascular, a vasomotricidade é influenciada pela ação de mediadores locais, vindos do endotélio, como extrínsecos, vindos do sistema nervoso autónomo⁽²⁷⁻²⁹⁾. O padrão de vasomotricidade é de elevada amplitude (50-100% de variação

de volume) e elevada frequência (5-25 ciclos por minuto - cpm) em pequenas arteríolas ($<30\ \mu\text{m}$), e de baixa amplitude (5-20% de variação de volume) e baixa frequência (0,3-3 cpm) em arteríolas de tamanho intermédio (30-80 μm). Estas alterações espontâneas de diâmetro produzem alterações significativas na resistência vascular, perfusão capilar e fluxo, sendo as alterações deste último apelidadas de “fluxomotricidade”⁽³⁰⁾.

A frequência e a intensidade destas contrações/dilatações podem ser alteradas fisiologicamente com o intuito de manter constante a perfusão de um tecido em resposta a alterações da pressão arterial. Quando a pressão arterial e, por conseguinte, a perfusão tecidual diminui, as arteríolas sofrem dilatação por forma tentar repor a perfusão. Pelo contrário, quando a perfusão aumenta por um aumento de pressão arterial, ocorre uma constrição arteriolar, a que se chama fenómeno de Bayliss⁽³¹⁾. Por este motivo, a atividade miogénica é também vista como um mecanismo de defesa intrínseco do próprio tecido, que o defende da isquémia ou sobreperfusão (e eventual rompimento de um vaso). Foi demonstrado com recurso à lei de Poiseuille que o aumento da atividade miogénica provoca a diminuição da resistência de um vaso ao fluxo sanguíneo e, portanto, o aumento do próprio fluxo⁽³²⁾.

Atualmente pensa-se que a oscilação rítmica do calibre destes vasos esteja intimamente ligada à oscilação da concentração citosólica de cálcio nas células musculares lisas^(33, 34). Vários estudos mostraram existir oscilações no potencial de membrana das células musculares lisas à mesma frequência das oscilações no calibre vascular⁽³⁵⁾, bem como a ocorrência de potenciais de ação em rajada em fase com oscilações na tensão da parede vascular⁽³⁶⁾. Pensa-se que estas oscilações possam ser geradas por células *pacemaker* neuronais, semelhantes às células de Cajal do intestino e localizadas na proximidade de bifurcações, sendo comunicadas às células contíguas por junções comunicantes^(37, 38). Outros estudos, no entanto, sugerem que o surgimento de potenciais *pacemaker* a partir de pontos específicos da árvore vascular seja improvável^(39, 40). Outra possibilidade é a de que quase todas as células musculares lisas possuam um potencial de membrana oscilatório assíncrono entre si, mas que seja comunicado entre células, sofrendo um ajustamento temporal⁽²⁵⁾. Quanto à origem das próprias oscilações do potencial de membrana, existem também diferentes propostas. Enquanto alguns estudos sugerem que as oscilações sejam provocadas pela própria atividade eletrogénica das bombas de sódio-potássio⁽³⁵⁾, outros

atribuem-no à atividade das bombas de cálcio do retículo endoplasmático. Segundo esta teoria, estas oscilações da concentração citosólica de cálcio provocariam a ativação de canais de cloreto dependentes de guanosina monofosfato cíclico (GMPC) que criariam oscilações no potencial de membrana. O monóxido de azoto (NO), importante mediador vasoativo endotelial, teria um papel importante neste mecanismo uma vez que aumentando a concentração celular de GMPC, aumentaria a probabilidade de uma oscilação sincronizada entre a concentração citosólica de cálcio e o potencial de membrana⁽²⁵⁾.

Quanto ao mecanismo de contração/dilatação miogénica induzida por alteração da pressão de perfusão, uma hipótese é a de que as membranas das células musculares lisas possuam canais iónicos associados a proteínas da matriz extracelular com função “mecanosensitiva”, detetando variações na distensão da própria membrana⁽⁴¹⁾. Em resposta a um aumento de perfusão, a distensão vascular será maior, o que ativará estas proteínas de membrana, que responderão por interação e abertura de canais de cálcio, promovendo a entrada deste ião na célula. À medida que a concentração citosólica de cálcio aumenta, iniciar-se-á uma ativação dos mecanismos contráteis celulares, que responderão com diminuição do calibre. Um mecanismo inverso acontecerá perante a redução da perfusão.

O endotélio é capaz de sintetizar vários mediadores vasoativos. Os principais mediadores vasodilatadores produzidos pelo endotélio são:

- o monóxido de azoto (NO), sintetizado pela monóxido de azoto sintase (MAS) e que se difunde livremente para as células musculares lisas adjacentes⁽⁴²⁾;
- os fatores de hiperpolarização derivado do endotélio (EDHF). Atualmente, pensam-se existir vários mediadores, incluindo eicosanóides, como a prostaciclina (PGI₂), ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs), e o peróxido de hidrogénio⁽⁴³⁾.

Para além destes mediadores, o endotélio também é capaz de libertar substâncias vasoconstritoras. O principal mediador com esta ação é a endotelina 1, que possui igualmente ação inflamatória e fibrótica. Em condições fisiológicas normais, a endotelina 1 não é secretada, provavelmente pela inibição levada a cabo pelo NO⁽⁴⁴⁾, sendo principalmente libertada em resposta a estímulos adequados, como seja, por exemplo, a hiperóxia^(45, 46).

As hemácias foram sempre vistas pela Ciência como células meramente transportadoras de oxigénio ao longo do sistema cardiovascular. Recentemente mostrou-se que as hemácias possuem uma outra função – a de atuar como sensores do nível de oxigénio tecidual através do seu grau de desoxigenação e, em função disso, induzir uma modificação no tónus vascular. Esses estudos mostraram que durante um estado de hipóxia as hemácias são capazes de libertar vasodilatadores como o NO^(47, 48) ou o ATP⁽⁴⁹⁾. Mostrou-se que as hemácias libertam ATP em resposta à hipóxia⁽⁵⁰⁾, em resposta à hipóxia na presença de hipercápnia⁽⁵¹⁾ e em resposta a deformação mecânica⁽⁵²⁾.

1.1.3.2. Regulação de longa duração da perfusão^(53, 54)

Os mecanismos de regulação a longo termo são mais “completos” na regulação da perfusão, e prendem-se sobretudo com a alteração da vascularização de um órgão em resposta a alterações na atividade metabólica dos mesmos. Esta alteração da vascularização manifesta-se não só por adaptações nos próprios vasos – geométricas, estruturais e funcionais – mas também pela criação de novos vasos – angiogénese, e pelo alargamento de vasos de circulações colaterais – arteriogénese.

A angiogénese define-se como a criação de capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existentes, e é iniciada principalmente pela hipóxia em tecidos isquémicos. Estes novos capilares consistem em tubos endoteliais desprovidos de estruturas vasculares próprias. Já a arteriogénese define-se como o alargamento de artérias colaterais pré-existentes e a sua remodelação para se tornarem vasos de condução. Este processo inicia-se pelo aumento de fluxo sanguíneo e, por conseguinte, da tensão de cisalhamento, nas artérias colaterais. Neste processo estão envolvidas vias específicas de comunicação arteriais, fatores de crescimento angiogénico, bem como células da parede vascular e circulantes.

1.2. Estudo *in vivo* da microcirculação

A avaliação *in vivo* da microcirculação recorre quer à avaliação de modelos humanos, quer de modelos animais, apesar das particularidades que caracterizam cada espécie. No presente estudo recorreremos a ambos os modelos, humano e animal (murganho), pelo que resumimos, nas páginas seguintes, algumas das diferenças anatomo-funcionais relevantes que registámos para ambas as espécies.

1.2.1. Anatomia funcional do membro inferior humano⁽⁵⁵⁾

A árvore vascular do membro inferior do humano, ilustrada nas figuras 4 e 5, tem início nas duas artérias ilíacas comuns, que resultam da bifurcação da artéria aorta ao nível da quarta vértebra lombar. Cada artéria ilíaca comum bifurca-se na artéria ilíaca interna e artéria ilíaca externa, ao nível da articulação sacroilíaca. A artéria ilíaca interna irriga principalmente a parede e vísceras pélvicas, enquanto que a artéria ilíaca externa irriga principalmente o membro inferior.

A artéria ilíaca externa envia ramos para a pele e músculos da parede abdominal e cintura pélvica, depois passa profundamente ao ligamento inguinal e passa a denominar-se artéria femoral. Esta localiza-se na parte anteriomedial da coxa e estende-se desde o ligamento inguinal até ao hiato tendinoso do adutor, inferiormente ao qual se converte na artéria popliteia. Origina seis artérias colaterais principais, entre as quais a artéria femoral profunda, que nasce na face posterior da artéria femoral, descendo lateral e posteriormente à mesma, e originando vários ramos que vascularizam os músculos e tegumentos da coxa.

A artéria popliteia origina-se no hiato tendinoso do adutor e termina no arco tendinoso do sóleo, onde se divide em artéria tibial anterior e tibial posterior. A artéria tibial anterior desce lateralmente à tíbia no compartimento anterior da perna, onde irriga os músculos extensores e chega ao ligamento anelar anterior do tarso, originando a artéria pediosa.

Da artéria popliteia nasce um segundo ramo que origina o tronco tíbio-peroneal. Este tronco divide-se em duas artérias principais, a artéria peroneal e a tibial posterior. A artéria peroneal desce pela zona posterior da perna até às extremidades inferiores do ligamento interósseo, emitindo ramificações para os músculos correspondentes. A artéria tibial posterior segue a face posterior da perna até alcançar o calcanhar. No seu trajeto emite ramificações para os músculos e ossos correspondentes, e ao chegar ao calcanhar ramifica-se nas artérias plantares interna e externa.

A plantar interna (medial) segue pela planta do pé, entre os músculos da região interna e média, até à cabeça do primeiro metatarso, originando a artéria colateral interna do dedo grande. No seu trajeto emite ramificações para o adutor oblíquo do dedo grande e para o osso, para o abdutor do dedo grande e tegumentos, para o flexor curto plantar e para o flexor curto do dedo grande. A artéria plantar externa (lateral) dirige-se anterior e lateralmente até à parte média do bordo lateral da planta do pé, onde passa a ter um trajeto profundo e formando o arco plantar profundo, que passa na base dos metatarsos e que termina na extremidade posterior do primeiro espaço interósseo do metatarso, irrigando ossos e músculos do pé. Na sua porção transversal forma o arco plantar. Da concavidade do arco nasce a artéria colateral externa do dedo pequeno e quatro artérias interósseas plantares que passam pelos espaços interósseos, dando origem às artérias interósseas dorsais.

A irrigação venosa do pé faz-se por duas redes vasculares, a rede venosa dorsal e a rede venosa plantar. A rede venosa dorsal localiza-se sobre a face anterior dorsal do pé e nela se destaca o arco venoso dorsal do pé que recebe sangue da rede superficial dorsal, das veias digitais dorsais e das veias interdigitais que anastomosam o arco venoso dorsal com o arco venoso dorsal, drenando-o para as veias safena maior e menor. A rede venosa plantar localiza-se na planta do pé e nela se destaca um arco venoso plantar, que drena no arco venoso dorsal. De cada lado da rede plantar nasce uma série de troncos coletores que rodeiam o bordo do pé e desembocam na veia safena correspondente.

Desde o maléolo, a veia safena maior sobe verticalmente pela face medial da perna, anteriormente ao bordo medial da tíbia, e depois contorna posteriormente a face lateral do côndilo medial do fémur. Ao chegar à coxa, drena na veia femoral 4 cm inferiormente ao

ligamento inguinal. A safena maior recebe algumas veias posteriores da rede dorsal do pé, veias superficiais da região anteriomedial da perna e a totalidade das veias subcutâneas da coxa. A veia safena menor, depois de ter contornado o bordo posterior do maléolo, alcança a linha média da perna seguindo um trajeto oblíquo súpero-medial. Até à região média da perna, esta veia é subcutânea, depois atravessa a fáscia e ascende verticalmente entre as duas cabeças do gastrocnémio, posteriormente ao nervo cutâneo sural medial. Na fossa popliteia a veia segue entre as fáscias da região. Ao alcançar o nível da linha interarticular dobra-se anteriormente e descreve uma curva, o arco da safena menor. Desemboca, depois, na face posterior da veia popliteia. Recebe um grande número de ramos venosos superficiais provenientes da região plantar lateral, do tornozelo, e das faces posterior e lateral da perna. Anastomosa-se na pele com as veias plantares laterais, e no tornozelo com as veias peroneais. Existe quase sempre uma veia anastomótica que comunica com as duas veias safenas, que nasce da safena menor ao nível da fossa popliteia, contornando-a obliquamente de baixo para cima e de trás para a frente na face medial da coxa, e abre-se na safena maior a uma distância variável da sua extremidade superior. Esta anastomose pode desembocar na veia safena acessória ou confundir-se com a mesma.

A veia popliteia resulta da união do tronco venoso tibioperoneano e das veias tibiais anteriores. É continuada pela veia femoral, recebe, por um lado, a veia safena maior. Os outros afluentes da veia femoral coincidem com os colaterais da artéria, com exceção das veias epigástricas superficiais, circunflexa ilíaca superficial e pudendas externa. A veia femoral profunda segue ao lado anteriomedial da sua artéria correspondente.

Estas veias drenam sangue nas tributárias profundas da ilíaca externa, recebendo esta sangue ainda pelas tributárias superficiais. Existem ainda veias tributárias da ilíaca interna, que drenam sangue para a veia cava inferior.

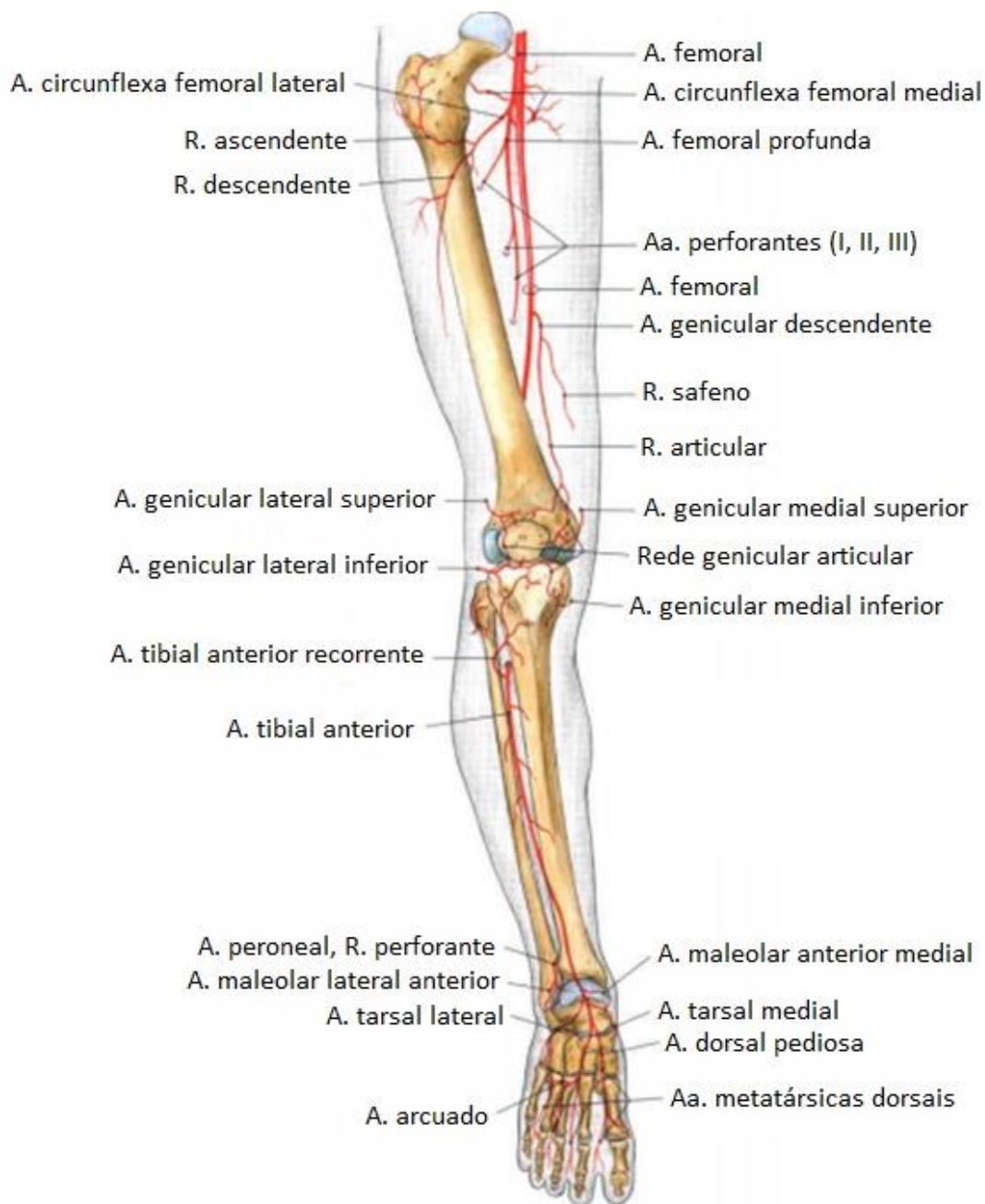


Figura 4. Árvore vascular arterial do membro inferior (A. – artéria, Aa. – artérias, R. – ramo) (adaptado de Putz and Pabst, 2006⁽⁵⁶⁾).



Figura 5. Árvore vascular arterial do pé (A. – artéria, R. – ramo) (adaptado de Putz and Pabst, 2006⁽⁵⁶⁾).

1.2.2. Anatomia funcional do membro posterior do murganho⁽⁵⁷⁾

A árvore vascular do membro posterior do murganho, ilustrada nas figuras 6 e 7, tem início no segmento abdominal da artéria aorta. Esta bifurca-se nas artérias ilíacas comuns esquerda e direita e artéria coccígea mediana, imediatamente após originar a artéria mesentérica caudal.

A artéria ilíaca comum apresenta um trajeto caudolateral, fornecendo alguns ramos, para se dividir de seguida em artérias ilíacas interna e externa. A artéria ilíaca externa tem um trajeto caudal e passa a denominar-se artéria femoral após passar por trás do ligamento inguinal. A artéria ilíaca comum origina a artéria glútea cranial, enquanto que a ilíaca externa origina a artéria glútea caudal. Estas artérias têm um trajeto caudodorsal lado a lado e alcançam a região dorsolombar. Proximalmente ao ponto de cruzamento com o ligamento inguinal, a artéria ilíaca externa origina o tronco pudendoepigástrico, um tronco curto que se divide na artéria epigástrica caudal e na artéria pudenda externa. A artéria

epigástrica caudal distribui-se para a parede abdominal, enquanto que a pudenda externa corre medialmente, paralela ao ligamento inguinal e termina na região perineal. A meio da coxa, as artérias caudal proximal e a epigástrica caudal superficial nascem da artéria femoral como um tronco muito curto ou de forma separada. A artéria epigástrica caudal superficial segue lateralmente ao longo do tecido muscular inguinal e forma uma anastomose com o ramo terminal da artéria iliolombar em redor do gânglio linfático subilíaco. A artéria safena desce pela superfície medial da perna e divide-se em ramos cranial e caudal. Na região distal dos músculos mediais da coxa ocorre uma distribuição apreciável de pequenos vasos que nascem da artéria safena.

A artéria ilíacofemoral nasce da extremidade distal da artéria ilíaca comum, dorsal à artéria ilíaca interna e segue um curso lateral enviando ramos para os músculos que a rodeiam. Aí a artéria ilíacofemoral desce até à região proximal do quadricípede após enviar ramos para os músculos glúteos. A artéria femoral dá origem à artéria femoral circunflexa lateral (femoral anterior) a partir da sua porção central. A femoral circunflexa penetra na região central do músculo quadricípede femoral juntamente com o ramo muscular do nervo femoral. A artéria femoral bifurca-se nas artérias popliteia e safena, proximais ao joelho e distais à artéria epigástrica caudal superficial. A artéria popliteia segue um curso lateral entre os músculos quadricípede e adutor até à fossa popliteia. A artéria femoral profunda ramifica-se na região proximal dos músculos adutores, isquiossurais e obturador externo. Na região glútea, a artéria glútea caudal termina na artéria pudenda interna e na artéria coccígea lateral. Perto do joelho a femoral caudal distal, a partir da popliteia, envia ramos para a região distal do bicípede femoral. A artéria femoral caudal distal dá também origem à proximal lateral geniculada que cursa a porção distal-lateral do quadricípede femoral.

A artéria safena origina dois ramos ao nível do joelho, a artéria marginal lateral, que origina as artérias digitais para cada um dos cinco dígitos, e a artéria medial tarsal que irriga a região posterior da pata.

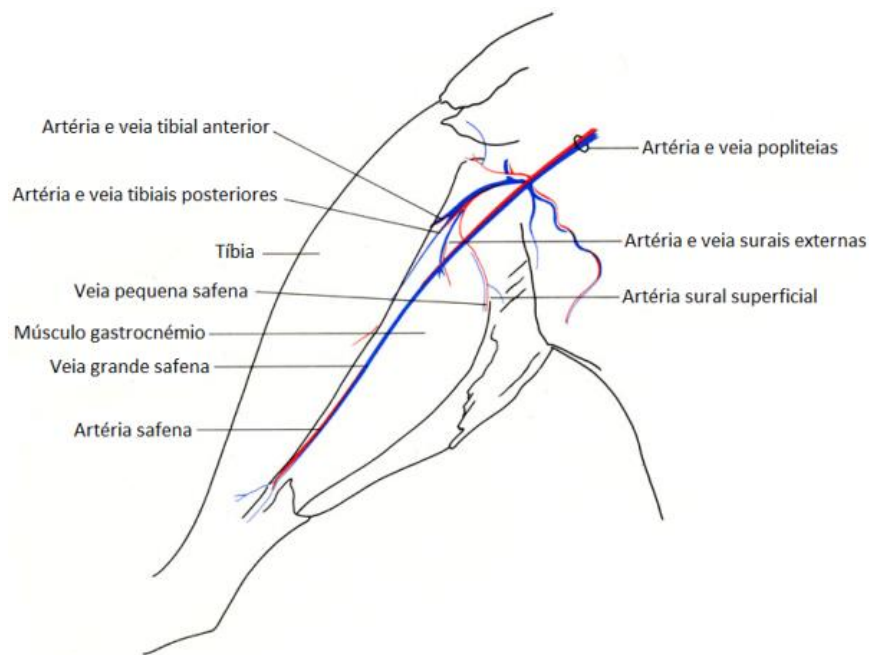


Figura 6. Árvore vascular do membro posterior do murganho, com destaque para a coxa (adaptado de Cook, 1965⁽⁵⁸⁾).

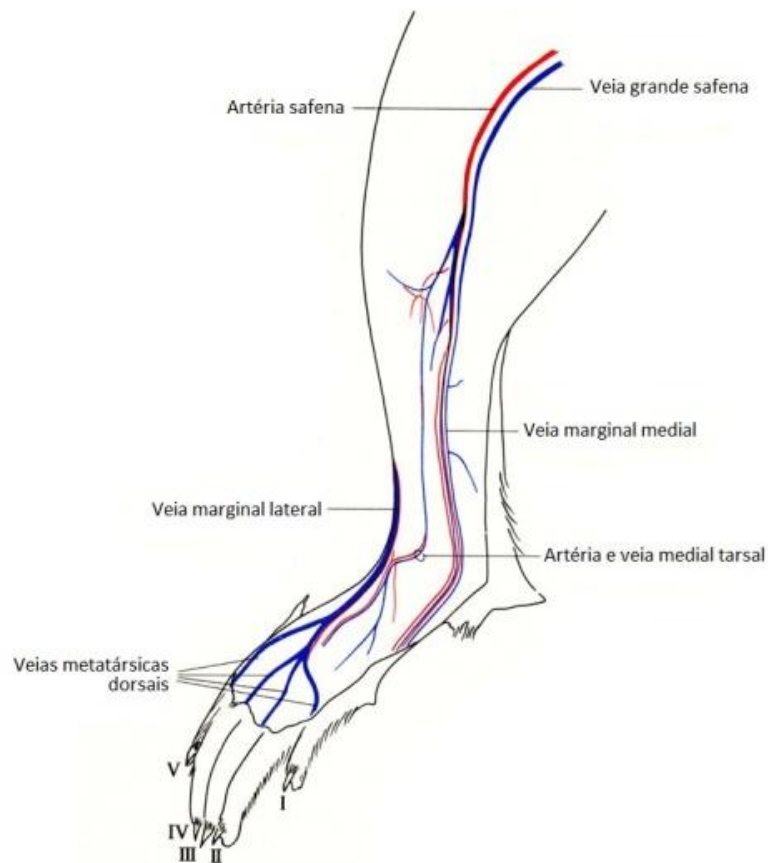


Figura 7. Árvore vascular arterial do membro inferior, com destaque para a perna e pata coxa (adaptado de Cook, 1965⁽⁵⁸⁾).

1.2.3. A pele como modelo de estudo da microcirculação

Pelo facto de ser o local onde a função principal da árvore vascular ocorre, isto é, a nutrição e oxigenação dos tecidos e remoção de produtos de metabolismo, a microcirculação é um alvo interessante para a investigação de mecanismos de instalação e progressão de doenças cardiovasculares e metabólicas⁽⁵⁹⁾. De facto, a disfunção microcirculatória é encontrada em determinadas doenças ainda antes de manifestações macrovasculares ou de órgãos-alvo⁽⁵⁹⁾. Está estabelecida uma co-linearidade no desenvolvimento e progressão de doença macrovascular e microvascular. Esta relação tem sido alvo de intensa investigação, com o objetivo de se estabelecer se é de natureza causal ou se se tratam de fatores de risco partilhados. A opinião atual é de que exista uma relação complexa e bilateral entre doença macrovascular e microvascular⁽⁵⁹⁾.

Pela sua acessibilidade, a pele tem sido proposta como um modelo de função e disfunção microcirculatória geral, estando implicada uma associação entre a doença microvascular na pele e noutros leitos vasculares. De facto, nos últimos anos, foi demonstrada a associação da disfunção microvascular cutânea na doença coronária, na doença renal de último estadio e na diabetes tipo 2. A pele tem recentemente sido usada como modelo de estudo de diversas doenças, cardiovasculares e metabólicas, como por exemplo hipertensão, hipercolesterolémia^(60, 61), diabetes tipo 2⁽⁶²⁾, hiperhomocisteinémia⁽⁶³⁾, doença renal⁽⁶²⁾, doença vascular periférica⁽⁶⁴⁾, doença coronária aterosclerótica⁽⁶⁵⁾, insuficiência cardíaca^(66, 67), esclerose sistémica⁽⁶⁸⁾ e envelhecimento primário⁽⁶⁹⁻⁷²⁾. Pela facilidade de acesso à sua rede vascular e da aplicação de técnicas não invasivas a pele tem sido tomada como um modelo potencialmente representativo de doenças vasculares, mas tal pressuposto é alvo de contestação⁽⁷³⁾.

1.2.4. A circulação cutânea humana

A pele possui uma rede vascular rica, com um nível de perfusão que excede largamente as suas necessidades nutritivas. Efetivamente, a atividade metabólica cutânea é reduzida, estando o excesso de perfusão envolvido na termorregulação, por forma a manter a temperatura interna num intervalo estreito⁽⁷⁴⁾. O fluxo sanguíneo cutâneo acaba, portanto, por oscilar entre os 7-8 L/min (~60% do débito cardíaco) em circunstâncias de dissipação de calor, e perto de zero, em circunstâncias de conservação de calor^(75, 76).

Os vasos sanguíneos da pele fazem parte das circulações arterial, venosa, bem como da microcirculação e da circulação linfática. A rede vascular cutânea, representada na figura 8, origina-se nas artérias perfurantes vindas dos músculos, e que formam o primeiro de dois plexos microvasculares horizontais – o plexo profundo, localizado próximo da junção dermo-hipodérmica, que fornece artérias nutritivas para os apêndices cutâneos. Deste plexo emergem arteríolas que formam o segundo plexo, denominado superficial ou subpapilar, na interface derme papilar - derme reticular. Aqui nascem novas arteríolas, estreitas, que originam capilares em forma de gancho que ascendem verticalmente até às papilas dérmicas, originando de seguida vénulas pós-capilares largas e que descem verticalmente de volta ao plexo superior. As ansas capilares seguem as linhas das impressões digitais (chamadas as “impressões digitais vasculares”)⁽⁷⁷⁾. A união dos dois plexos vasculares completa-se com a emissão de vénulas do plexo superficial que descendem verticalmente para o plexo profundo.

Na pele das regiões distais glabras (sem pelo), como os dedos, a prega ungueal, o nariz e as orelhas, as arteríolas e vénulas comunicam diretamente por estruturas vasculares chamadas anastomoses arteriovenosas (AAV). Estas estruturas têm tipicamente um comprimento reduzido e uma parede muscular mais espessa que a das arteríolas que as originaram. De facto, para além de uma camada muscular lisa circular, as AAV possuem uma segunda camada muscular de orientação longitudinal. As AAVs localizam-se em ambos os plexos microvasculares e são estruturalmente heterogéneas^(77, 78). Nas AAV o sangue faz um *bypass* às ansas capilares nutritivas^(79, 80), não existindo, portanto, transporte de substâncias para os tecidos e vice-versa. Como tal, pensa-se que a sua função principal seja a de

contribuir para a termorregulação^(79, 80), transportando o calor de regiões profundas do corpo (*core*) para regiões superficiais. Quando é necessário conservar calor, as AAVs mantêm-se predominantemente fechadas, enquanto que durante a eliminação de calor sofrem dilatação completa^(81, 82). As zonas da pele ricas em AAVs estão expostas a atividade simpática adrenérgica mais intensa em condições termoneutras, bem como durante ativação simpática reflexa e durante a exposição ao frio⁽⁸³⁾.

O sistema linfático cutâneo origina-se em capilares linfáticos que formam um plexo superficial na derme sub-papilar, e um plexo profundo abaixo do plexo vascular profundo sanguíneo. A rede linfática está particularmente bem desenvolvida na pele dos dedos, palmas, plantas e escroto.

A vasculatura cutânea recebe tanto inervação sensorial como inervação autonómica. Os nervos sensoriais distribuem-se pela epiderme, derme e hipoderme numa rede tridimensional, encontrando-se a maioria na derme média e derme papilar. A distribuição de nervos autonómicos, pelo contrário, está restringida apenas à derme, innervando vasos sanguíneos, AAVs, vasos linfáticos, glândulas écrinas e apócrinas, folículos pilosos e músculos eretores do pelo. Como tal, a inervação autonómica está associada à regulação do fluxo sanguíneo, da função linfática e da função dos apêndices cutâneos⁽⁸⁴⁾.

O controlo autonómico da perfusão cutânea depende do tipo de pele. Na pele não glabra a inervação vascular é simpática dual, feita por fibras adrenérgicas constritoras e fibras colinérgicas dilatadoras. Já a pele glabra, encontrada nas palmas, plantas e lábios, recebe apenas inervação simpática adrenérgica que, na maior parte dos casos gera vasoconstrição mas pode também provocar vasodilatação⁽⁸⁹⁾. Outra distinção entre pele glabra e não glabra é a densidade de AAV. Na pele glabra, as AAV são numerosas e ricamente innervadas por fibras simpáticas vasoconstritoras. Portanto, nessas zonas, a abertura ou encerramento destas AAV pode causar alterações substanciais no fluxo sanguíneo. Em contraste, a pele não-glabra contém poucas AAV e é innervada por ambas as divisões simpáticas⁽⁸⁹⁾.

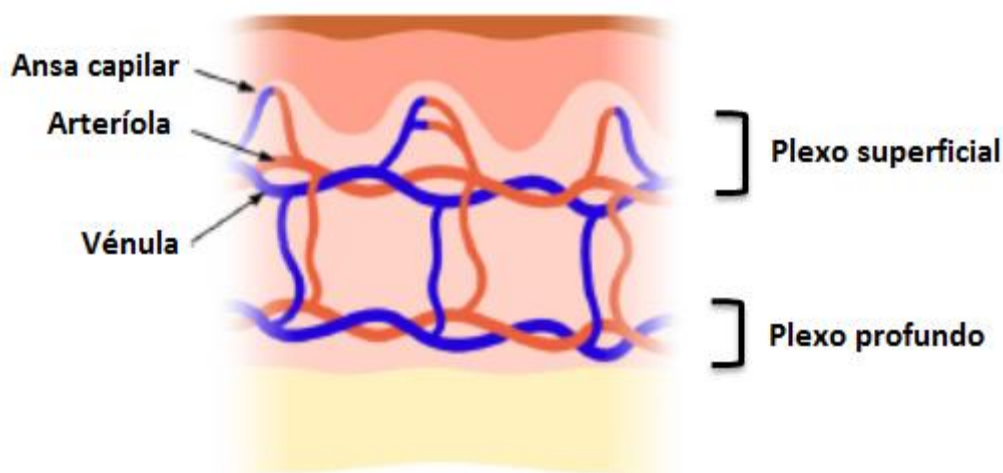


Figura 8. Esquema ilustrativo da arquitetura da microcirculação cutânea. O plexo inferior envia arteríolas para o superior que, por sua vez envia ansas capilares no sentido superior e vénulas para o plexo inferior (adaptado de Zakharov *et al.*, 2010⁽⁹⁰⁾).

1.2.5. Diferenças anátomo-funcionais cutâneas do humano e do murganho⁽⁹¹⁾

A pele do murganho organiza-se, tal como a do humano, em três camadas – a epiderme, a derme e a hipoderme. A epiderme é muito fina em todas as regiões não glabras, e consideravelmente mais espessa nas regiões glabras, como os mamilos, ânus, cauda e patas⁽⁹¹⁾.

A pele mais espessa consiste em quatro camadas⁽⁹²⁾. A mais profunda, o estrato germinativo, consiste numa camada celular única apoiada numa membrana basal adjacente à derme. Imediatamente acima encontra-se o estrato espinhoso, constituído por quatro a cinco camadas celulares. De seguida encontra-se o estrato granuloso e acima deste, o estrato córneo. A derme consiste sobretudo de tecido conjuntivo, bem como de vasos sanguíneos, terminações nervosas e adipócitos⁽⁹¹⁾. A pele dos machos é consideravelmente mais forte, o que se deve à maior espessura da derme, enquanto a das fêmeas apresenta maior espessura ao nível da epiderme e hipoderme.

Em comparação com o humano, a epiderme do murganho é mais fina, com menor número de camadas celulares, e a derme é igualmente mais fina⁽⁹³⁾. A pele do murganho possui ainda uma camada paniculosa difusa, que no humano é encontrada apenas na região do pescoço. A pele do murganho parece ser também mais complacente que a do humano,

em termos mecânicos. A pele do murganho é desprovida de glândulas sudoríparas apócrinas e de cristas epidérmicas/papilas dérmicas, que são encontradas na pele humana.

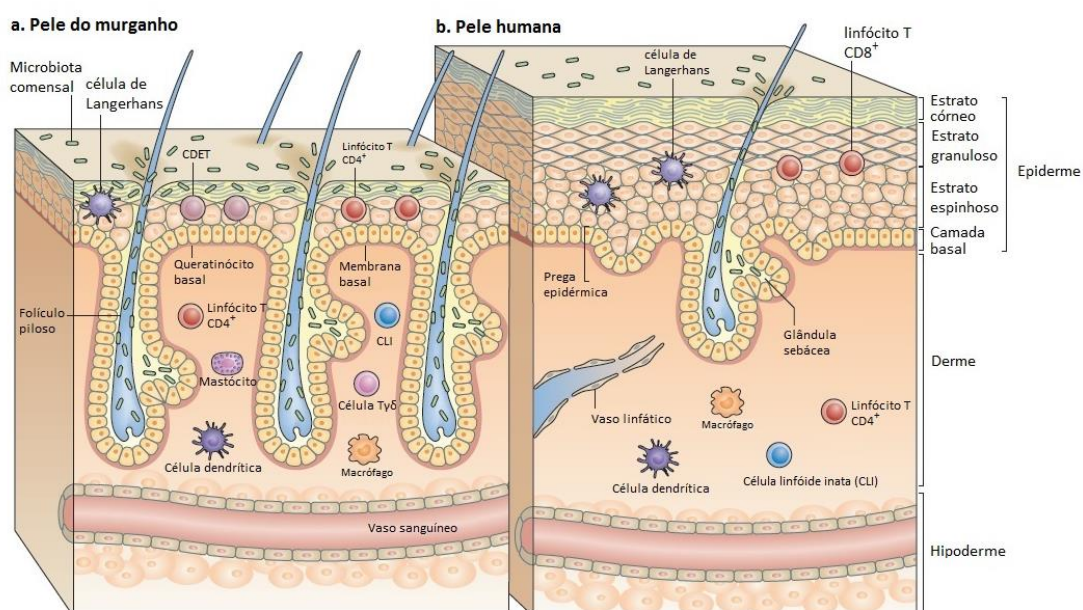


Figura 9. Representação esquemática da pele do murganho (a) e do humano (b) (adaptado de Pasparakis *et al.*, 2014⁽⁹³⁾).

1.2.6. Principais técnicas e métodos de avaliação não-invasiva da microcirculação

A utilização de técnicas para monitorizar a microcirculação é um desenvolvimento recente em medicina e tem crescido exponencialmente nos últimos 75 anos. Foram desenvolvidas técnicas que permitem distinguir alterações na morfológicas e funcionais em leitos vasculares superficiais e profundos. Cada técnica apresenta as suas vantagens e desvantagens⁽⁵⁹⁾. A principal desvantagem das técnicas de monitorização da microcirculação é o elevado tempo de utilização, que limita a sua utilização na clínica bem como em estudos populacionais⁽⁵⁹⁾. Idealmente, a medição da microcirculação deveria ser não invasiva, deveria fornecer medições contínuas e reprodutíveis, independentes das características do tecido, e fornecer resultados num curto espaço de tempo. Para além disso, para ser aplicada à prática clínica, deverá apresentar resultados compreensíveis com intervenção mínima. Abaixo discute-se sucintamente o princípio físico das principais técnicas não invasivas de avaliação da microcirculação.

1.2.6.1. Capilaroscopia

A capilaroscopia é uma técnica que consiste na visualização dos capilares *in vivo* por microscópica ótica⁽⁹⁴⁾. No início, a técnica dependia da utilização de epiluminação de luz fria, com um intervalo de ampliação de 15 a 100x, uma elevada profundidade de campo que permitia a avaliação das diferentes profundidades dos capilares. Este *set-up* experimental permitia apenas a observação os capilares da prega ungueal dos dedos das mãos⁽⁹⁵⁾ e pés⁽⁹⁶⁾. Na verdade, o que se observava não eram as paredes dos capilares, mas sim as hemácias alinhadas junto às mesmas⁽⁹⁷⁾, definindo ansas paralelas entre si e apontadas para a ponta dos dedos. A técnica evoluiu no sentido de utilizar câmaras de vídeo miniaturizadas munidas de fonte de luz, sistema de amplificação e software de análise de imagem, permitindo analisar vários parâmetros morfológicos dos capilares, como o diâmetro, o comprimento, a área e a densidade⁽⁹⁸⁾. Estes avanços permitiram a aplicação da técnica a todas as zonas da pele. Avanços mais recentes permitiram ainda a quantificação do fluxo sanguíneo nos capilares do plexo cutâneo superior pela determinação do tempo de trânsito das hemácias num único capilar⁽⁹⁹⁾.

1.2.6.2. Fotopletismografia ⁽¹⁰⁰⁾

A fotopletismografia mede as variações do volume vascular cutâneo. Utiliza uma fonte de luz (vermelha, infravermelha, azul ou verde) e um fotodetector. À medida que a luz entra na pele, é desviada, refletida, refratada e absorvida antes de alcançar o fotodetector, sendo o grau de absorção dependente do volume de sangue no tecido. Por sua vez, o volume de tecido é inversamente proporcional ao sinal registado. Os parâmetros medidos com a fotopletismografia incluem o volume sanguíneo venoso, o volume sanguíneo arterial pulsátil, e ainda parâmetros da morfologia da onda de pulso, usada para a avaliação da rigidez arterial. As suas principais vantagens são o seu custo reduzido e facilidade de operação, e as suas limitações são a sua baixa sensibilidade e reprodutibilidade.

1.2.6.3. Fluxometria por laser Doppler (LDF)⁽¹⁰¹⁾

A fluxometria por laser Doppler (*laser Doppler flowmetry* - LDF) tornou-se, ao longo dos últimos 20 anos, uma das mais populares técnicas de avaliação da microcirculação cutânea. É uma técnica não invasiva que permite um registo sensível, contínuo e em tempo real do fluxo sanguíneo cutâneo sem ser influenciado pelo fluxo sanguíneo dos tecidos musculares adjacentes. Baseia-se na emissão de uma luz laser monocromática e com coerência temporal e espacial. Esta luz, ao atravessar a pele, colide com as hemácias em movimento e sofre uma alteração de frequência (desvio de Doppler), proporcional à velocidade de movimento das hemácias. A luz refletida detetada é convertida em *output* elétrico, que é alimentado por um filtro de passas-altas e amplificadores para ser obtido o sinal como uma flutuação de voltagem, expressa em milivolt. O sinal de LDF é uma representação estocástica do número de hemácias no volume de amostra multiplicado pela sua velocidade, sendo referido como “fluxo”. Dado existir uma correlação linear entre o verdadeiro fluxo sanguíneo cutâneo e o sinal de LDF, este é usado como uma estimativa do fluxo sanguíneo.

1.2.6.4. Imagem por laser Doppler (LDI)⁽¹⁰²⁾

A imagem por laser Doppler (*laser Doppler imaging* - LDI) é uma técnica que faz uso, tal como o LDF, do princípio de Doppler, mas, ao contrário daquele, não envolve o contacto entre a sonda e a pele. A técnica utiliza um laser, um sistema de deteção ótico e um computador. A região de interesse é definida e mapeada, na qual os fotões colidem com as hemácias em movimento e a sua frequência Doppler é alterada consoante a velocidade e concentração das hemácias no tecido. Esta alteração de frequência é detetada no fotodetetor e o software de análise gera um perfil de perfusão colorido da região definida, permitindo o mapeamento do fluxo sanguíneo através da superfície da pele. É vantajoso em relação ao LDF por permitir a avaliação do fluxo numa região do corpo ao invés de um único ponto, para além de não requerer o contacto direto entre a sonda e a pele, evitando

eventuais alterações no fluxo. No entanto, não permite fazer registos contínuos nem avaliar o efeito dos mecanismos de regulação do fluxo num dado momento.

1.2.6.5. Imagem por ressonância magnética⁽¹⁰³⁾

A imagem por ressonância magnética (*magnetic resonance imaging* - MRI) utiliza um campo magnético para alinhar os *spin* dos núcleos atómicos que possuem um número ímpar de protões, neutrões ou ambos. Neste estado, os protões são capazes de absorver energia, que é aplicada na forma de ondas de rádio. Esta absorção de energia causa o realinhamento do *spin* nuclear na direção desta fonte de energia mais forte. Quando a fonte de ondas rádio é desligada, os núcleos emitem frequências rádio enquanto retornam ao seu estado de energia mais baixa. É esta movimentação que é usada para construir uma camada da imagem final de ressonância magnética. Para se construir uma imagem tridimensional são usadas múltiplas camadas, conseguidas pela transmissão de múltiplas ondas rádio a diferentes frequências no espaço. A resolução espacial das imagens é determinada pela distribuição dos núcleos nos diferentes tecidos, mas também pelas taxas de retorno ao estado inicial, a taxa de recuperação do *spin* axial e também pelos diferentes alinhamentos destes núcleos em relação à energia aplicada. A MRI permite também estimar a velocidade sanguínea. Para isso utiliza-se a variante MRI por contraste de fase, que estima o desvio de fase dos núcleos de hidrogénio à medida que estes passam por um campo magnético, sendo este desvio de fase proporcional à velocidade. As principais limitações desta técnica são o elevado custo por medição, o elevado tempo de análise, a utilização de um campo magnético, e o facto de se poderem avaliar apenas estados basais e não alterações dinâmicas circulatórias.

1.2.6.6. Imagem por polarização espectral ortogonal⁽¹⁰⁴⁾

A imagem por polarização espectral ortogonal permite a visualização dos vasos sanguíneos superficiais sem recurso a um microscópio. O tecido é iluminado com luz verde

polarizada, sendo a luz refletida detetada por uma câmara de vídeo com um filtro polarizante orientado a 90° em relação à luz emitida. Pelo facto deste segundo polarizante bloquear a luz refletida por camadas superficiais, apenas a luz refletida por camadas mais profundas no tecido poderá passar o segundo polarizante, aumentando a visibilidade das hemácias. Os movimentos das hemácias e a perfusão podem ser quantificados dinamicamente por software de análise de imagem.

1.2.7. Métodos

As medições do fluxo sanguíneo cutâneo em condições basais não são particularmente úteis para a avaliação dos mecanismos de regulação, pois mostram grandes flutuações dependendo de vários condicionantes intrínsecos (do indivíduo) e extrínsecos (ambientais, por exemplo). Como tal, são utilizados frequentemente testes de provocação envolvendo a aplicação de estímulos não invasivos, sendo o fluxo sanguíneo medido antes, durante e depois desta aplicação^(59, 105). Estes testes visam alterar as condições basais de perfusão, evocando respostas compensatórias, cujo perfil permite distinguir estados fisiológicos de fisiopatológicos. Desta forma, os testes de provocação aumentam a capacidade discriminatória das técnicas de monitorização utilizadas.

Os testes de provocação utilizados *in vivo* podem ser divididos, de uma maneira geral, em provocações sistémicas e locais. As provocações sistémicas incluem alterações da posição dos membros⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾, oclusão supra-sistólica de um membro⁽¹⁰⁷⁻¹¹⁰⁾, manobras respiratórias, como a manobra de Valsalva⁽¹¹¹⁾, a inspiração profunda⁽¹¹²⁾, e a respiração de oxigénio a diferentes concentrações^(108, 113-115), testes de stresse mental^(116, 117) e o aquecimento⁽⁶⁹⁾ ou arrefecimento⁽¹¹⁸⁾ de todo o corpo. Já nas provocações locais encontram-se a aplicação de fármacos por via tópica^(119, 120) ou por iontoforese⁽¹²¹⁻¹²⁴⁾, o aquecimento^(125, 126), bem como o arrefecimento de partes do corpo^(127, 128).

Capítulo II : Objetivos, Materiais e Métodos

O estudo da microcirculação *in vivo* está facilitado pela utilização de tecnologias sensíveis e não invasivas. No entanto, devido à interferência de diversos fenômenos biológicos, os sinais de fluxo sanguíneo obtidos são complexos e de difícil interpretação, representando, por isso, um desafio à compreensão dos mecanismos de regulação da função microcirculatória. A exploração do sinal de LDF, em particular das suas componentes oscilatórias, torna-se, então, essencial para o estudo da regulação da microcirculação em condições de perfusão normal e alterada, pelo que orientámos o presente estudo, no sentido de aprofundar o nosso conhecimento sobre a fisiologia circulatória, através da questão *“qual a contribuição das componentes oscilatórias do sinal de LDF para a regulação da função microcirculatória?”*

Para responder a esta pergunta estabelecemos os seguintes objetivos:

- (i) desenvolver metodologias que permitam obter parâmetros funcionais microcirculatórios *in vivo* em indivíduos saudáveis de diferentes idades, e caracterizar eventuais alterações relacionadas com o envelhecimento;
- (ii) encontrar as melhores ferramentas de análise fina do sinal de LDF;
- (iii) desenvolver um modelo animal que permita testar os instrumentos até aqui desenvolvidos, olhando mais aprofundadamente, se possível, para os fenômenos em causa.

2.1. Primeiro objetivo: desenvolver metodologias que permitam obter parâmetros funcionais microcirculatórios *in vivo* em indivíduos saudáveis de diferentes idades, e caracterizar eventuais alterações relacionadas com o envelhecimento

2.1.1 Tecnologias de medição

2.1.1. Técnicas

2.1.1.1. Fluxometria por laser Doppler (LDF)

A técnica de fluxometria por laser Doppler (LDF) baseia-se na quantificação da variação de frequência sofrida por uma luz laser emitida quando atravessa um tecido e é refletida pela colisão com estruturas móveis, como seja o caso das hemácias, os elementos mais numerosos em circulação^(101, 129). A maior parte dos aparelhos de LDF utilizam elementos de gás hélio-néon ou de arsenieto de gálio para produzir um feixe de luz laser fraco, monocromático, com coerência temporal e espacial e com baixa penetração tecidual. Este tipo de luz laser não altera os tecidos sob avaliação nem produz nos mesmos um aumento de temperatura⁽¹⁰¹⁾.

Quando a luz laser atravessa um tecido, colide com várias estruturas. Se essas estruturas estiverem em movimento irão refletir a luz a uma frequência diferente daquela com que foi emitida. Essa diferença de frequências toma o nome de efeito de Doppler e é proporcional à velocidade de fluxo das hemácias⁽¹⁰¹⁾. A maioria dos tecidos, entre os quais os da pele, é relativamente opaca, dado que contém materiais que refratam a luz em várias e aleatórias direções. O sangue constitui uma pequena fração do volume de um tecido, exceto aquele contido nos grandes vasos, e a maior parte da refração da luz deve-se a pequenas partículas e elementos tecidulares estacionários. Como tal, apenas elementos móveis do tecido iluminado, maioritariamente hemácias, causarão um desvio de Doppler na frequência da luz⁽¹⁰¹⁾.

Considere-se uma hemácia a mover-se na direção V com velocidade $|V|$. Um feixe laser de frequência f_i (número de vibrações eletromagnéticas/s) incide nesta hemácia, fazendo um ângulo α_i com V . A hemácia dispersa a luz laser em várias direções. Na direção de dispersão definida pelo ângulo α_s que faz com V , a frequência da luz difere de f_i pela quantidade:

$$\Delta f = \frac{nV(\cos\alpha_s - \cos\alpha_i)}{\lambda_i} \quad [15]$$

em que Δf é o desvio de Doppler e λ_i é o comprimento de onda do laser no sangue, dado por:

$$\lambda_i = \frac{c}{n \cdot f_i} \quad [16]$$

correspondendo c à velocidade da luz no vácuo e n ao índice de refração da luz no sangue⁽¹³⁰⁾.

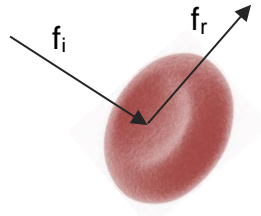


Figura 10. Esquema ilustrativo simplificado da emissão de um feixe fotônico que incide numa hemácia em movimento com uma determinada frequência (f_i), sendo refletida com uma outra frequência (f_r).

Quando um feixe de laser ilumina hemácias a moverem-se numa rede de capilares com várias velocidades e direções, a luz dispersada pelas hemácias e que alcança o detetor consiste na somação de ondas com vários desvios de Doppler (Δf_i). O espectro da potência do desvio Doppler (*Doppler Shift Power Spectrum* - DSPS) é a representação gráfica da potência das ondas desviadas pelo efeito de Doppler em função da frequência do desvio. Em geral, o DSPS é uma função que decresce monotonicamente com a frequência⁽¹³⁰⁾. As seguintes considerações aplicam-se:

- (1) a maior parte da luz que emerge do tecido não apresenta desvio de Doppler porque sofreu dispersão por componentes estruturais estáticos. Apenas 1-5% da luz detetada foi dispersa pelas hemácias em movimento;
- (2) a luz que não sofreu desvio atua como sinal de referência (frequência f_r), que é óticamente misturado à superfície do fotodetetor com a luz dispersada pelas

hemácias em movimento com velocidade v_i (frequência $f_r + \Delta f_i$). Este processo toma o nome de mistura de heteródinos. Como a luz de referência tem muito mais potência que a luz dispersada pelas hemácias, esta mistura produz uma corrente no *output* do detetor que consiste numa somação de ondas oscilando entre as frequências $(f_r + \Delta f_i) - f_r$. Como tal a corrente no fotodetetor contém precisamente os desvios de Doppler que se pretendem medir. O DSPS é extraído do sinal por análise de Fourier da fotocorrente⁽¹³⁰⁾.

A análise do DSPS permite a determinação dos seguintes parâmetros hemodinâmicos:

- Vel (em Hz), proporcional à velocidade média das hemácias no volume “percorrido” pela luz laser;
- Vol, proporcional ao número de hemácias neste volume.

O fluxo, F, será então dado pela expressão:

$$F = \text{constante} \times \text{Vel} \times \text{Vol} \quad [17]$$

Tanto Vol como F são expressas em unidades arbitrárias. Isto deve-se ao facto de a luz laser incidente no tecido ser refletida, dispersada e absorvida em várias quantidades. Estes últimos dois processos influenciam a penetração no tecido, que pode diferir de uma região para outra. Assim, variações temporais ou espaciais na estrutura e vascularização dos tecidos vão afetar a medição dos parâmetros hemodinâmicos. Para além disso, a comparação dos parâmetros hemodinâmicos de diferentes tecidos pressupõe que estes possuem propriedades óticas iguais⁽¹³⁰⁾. A determinação destes parâmetros é baseada na teoria de Bonner e Nossal (1990)⁽¹³¹⁾, que constitui a base do LDF. Esta teoria requer que a luz dispersada pelas hemácias seja “recolhida” a uma distância r do local de incidência do feixe de laser. No caso da perfusão cutânea r está entre 1 e 2 mm.

Os ângulos de refração e velocidades das hemácias são variáveis, e só podem ser determinadas em sentido estatístico. Como tal, o sinal de LDF é uma representação estocástica do número de células do volume de tecido amostrado multiplicado pelas suas velocidades⁽¹⁰¹⁾. A luz refletida é transmitida através de uma ou mais fibras recetoras, e os

feixes que sofreram desvio e os de referência (sem desvio Doppler) são misturados num fotodetector e processados. O sinal é depois convertido num *output* elétrico que é alimentado em filtros de alta passagem e amplificado⁽¹⁰¹⁾.

As limitações à utilização regular da técnica de LDF, particularmente na área clínica, podem dividir-se em limitações de natureza técnica e metodológica. A principal limitação técnica é a impossibilidade de se quantificar fluxo sanguíneo real. Apesar de se ter mostrado uma correlação linear entre o sinal de LDF e o fluxo sanguíneo medido por outras técnicas⁽¹⁰¹⁾, o sinal de LDF é, na realidade, uma estimação do fluxo sanguíneo, uma vez que não se conhecem variáveis como o volume exato de tecido avaliado, a direção do fluxo sanguíneo, a quantidade e o tamanho dos vasos no volume medido^(132, 133). Não existe consenso entre fabricantes quanto à adoção de um único termo que se refira aos valores extraídos do LDF. Em termos físicos, o termo mais correto é de unidades relativas de perfusão (URP), sendo também usados os termos volt, milivolt, unidades de perfusão (UP) ou unidades arbitrárias (UA). Apesar destas limitações é também aceite o termo “fluxo” na comunidade científica. O próprio algoritmo de cálculo da perfusão – velocidade × concentração – constitui também uma limitação à utilidade do LDF. Duas situações ilustram esta limitação: numa rede capilar rarefeita, mas com uma elevada velocidade de circulação das hemácias, o sinal de LDF medido poderá ter uma amplitude normal ou elevada; já numa rede capilar de diâmetros elevados, a concentração de hemácias será elevada, mas a sua velocidade baixa, sendo medido também um sinal de LDF com amplitude normal. Por conseguinte, mesmo em redes microcirculatórias com compromisso estrutural, esse efeito poderá não ser visível em registos basais de perfusão. Outra limitação técnica encontrada é a falta de um padrão-ouro contra o qual possa ser comparada, em particular para o estudo da pele. Finalmente, cada fluxímetro dá os seus próprios valores, não podendo ser comparados diretamente os valores de diferentes aparelhos.

A principal limitação metodológica do uso do LDF é a necessidade de tempos de medição muito elevados para se obterem registos estáveis e, sobretudo, para se fazer determinado tipo de análise dos registos obtidos, como sejam as análises espectrais^(122, 134). Este elevado tempo de medição é também a causa da limitada utilização do LDF na clínica. Por outro lado, é frequente encontrarem-se artefactos conhecidos como picos (*spikes*) ou “*TRAnsient Signal Highvalues*” (TRASH)⁽¹³⁵⁾. Estes TRASH podem dever-se a movimentos das

fibras óticas, da cabeça da sonda sobre o tecido, ou mesmo de fenómenos fisiológicos de curta duração (movimentos tecidulares, deslocamento de sangue arterial pela compressão pneumática no início de uma oclusão vascular)⁽¹³⁶⁻¹⁴²⁾. Por forma a minimizar artefactos de movimento, as medições devem ser feitas com os indivíduos/animais tão imóveis quanto possível.

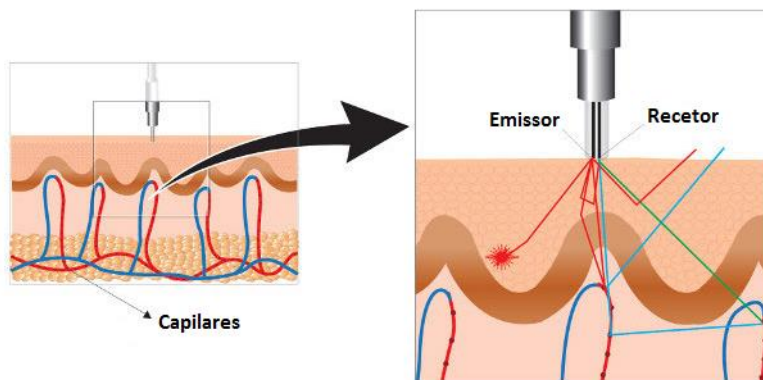
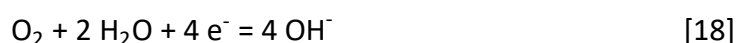


Figura 11. Esquema ilustrativo dos trajetos da luz laser na pele, numa medição feita por LDF (adaptado de Perimed⁽¹⁴³⁾).

2.1.1.2. Gasimetria transcutânea

A gasimetria transcutânea permite determinar o valor da pressão parcial de oxigénio (pO_2) na epiderme viável, ou seja, a sua pressão parcial transcutânea ($tcpO_2$) com recurso à polarigrafia. O sensor de gasimetria transcutânea está equipado com um eletrodo de Clark, que consiste num cátodo de platina, um ânodo de prata ($Ag/AgCl$) e um eletrólito (ex.: cloreto de potássio), coberto por uma membrana hidrofóbica (ex.: teflon, polipropileno) permeável apenas a gases. Quando é aplicada uma voltagem adequada (voltagem de polarização) entre o cátodo e o ânodo ocorrem as seguintes reações:



A corrente elétrica gerada, representada nas equações 18 e 19 por e^- , é proporcional à concentração de oxigênio no tecido medido. Para converter a corrente gerada em unidades de pressão (ex.: mm Hg), o sistema tem de ser calibrado com um gás cuja concentração em oxigênio seja conhecida. Para que o oxigênio do sangue se possa difundir, é necessária a presença de um elemento de aquecimento no sensor, geralmente controlado por termístores. Modelos recentes destes sensores combinam elétrodos para a detecção simultânea de oxigênio e de dióxido de carbono⁽¹⁴⁴⁾.

A maior parte dos sensores é capaz de gerar temperaturas entre os 27 e os 45 °C, sendo utilizado frequentemente o intervalo entre 43 e 45°C. Esta temperatura promove simultaneamente a vasodilatação, criando uma hiperémia local, mas também facilita a dissociação do oxigênio da hemoglobina, explicado pelo deslocamento da curva de dissociação da oxi-hemoglobina para a direita⁽¹⁴⁵⁾. Através de ambos estes mecanismos, estará aumentado o fluxo de oxigênio dos capilares para a pele. Por conseguinte, quanto maior a temperatura do sensor, maior o valor de $tcpO_2$ e, portanto, mais próximo estará o valor de $tcpO_2$ próximo do valor de pO_2 arterial (p_aO_2). Por outro lado, a temperatura promove a dissolução da estrutura lipídica em torno das células queratinizadas mortas da epiderme, tornando-a mais permeável à difusão gasosa. Apesar disso, o valor de $tcpO_2$ é sempre ligeiramente inferior ao de p_aO_2 devido ao consumo de oxigênio pela pele e pelo elétrodo. Em indivíduos adultos, o espessamento do estrato córneo dificulta a difusão do oxigênio através da pele e, portanto, diminui o valor de $tcpO_2$. Apesar destes fatores, a correlação entre $tcpO_2$ e pO_2 é considerada excelente. Uma vez colocado na pele o elétrodo aquecido, é necessário um período de 15-20 min para que ocorra hiperémia máxima e, como tal, a estabilização dos valores de $tcpO_2$.

2.1.1.3. Evaporimetria

A evaporimetria é a técnica mais utilizada atualmente para quantificar a perda transepidérmica de água (PTEA). A PTEA refere-se atualmente à quantidade total de vapor de água que passa através da pele para o ar ambiente. Este vapor de água tem duas proveniências, a perda por difusão passiva através do estrato córneo, e a perda por

sudorese. Por conseguinte, a PTEA só reflete a função de “barreira” do estrato córneo na ausência de sudação. É uma variável particularmente útil no estudo de condições onde se verifique a alteração funcional do estrato córneo, como sejam a exposição a substâncias irritantes, em contexto laboratorial ou ocupacional.

Na ausência de forças de convecção a superfície da pele está coberta por uma camada de vapor de água, que constitui uma “zona de transição” para o transporte de humidade e calor entre a pele e o ar ambiente. Assumindo a superfície da pele como sendo impermeável à água, o processo de troca de água nesta “zona de transição” é explicado pela lei de Fick da difusão:

$$\frac{dm}{dt} = -DA \frac{dp}{dx} \quad [20]$$

onde:

$\frac{dm}{dt}$ = transporte de água (g)

m = água transportada

t = tempo (h)

D = constante de difusão (= 0.0877 g/m(h(mmHg)))

A = superfície (m²)

p = pressão de vapor atmosférica (mm Hg)

x = distância da superfície da pele ao ponto de medição (m)

O fluxo de difusão $\frac{dm}{dt}$ indica a massa de água transportada por centímetro quadrado por período de tempo. Este fluxo de difusão pode ser expresso em termos de gradiente de pressão de vapor, que é aproximadamente constante na ausência de forças de convecção e em condições estáveis. Este gradiente é calculado a partir da diferença entre os valores de pressão de vapor medidos a duas alturas diferentes situadas acima da superfície da pele, perpendiculares à mesma, e dentro da zona de difusão.

A pressão de vapor em cada um desses pontos é calculada por

$$p = HR p_{sat} \quad [21]$$

onde:

p = pressão de vapor de água

HR = humidade relativa (%)

p_{sat} = pressão de vapor de saturação

A humidade relativa (HR) é medida por sensores de capacitância baseados num polímetro orgânico com sensibilidade dielétrica (higrossensores). A pressão de vapor de saturação é determinada exclusivamente a partir da temperatura medida por um termómetro. Estes sensores (higrossensores e termómetro) estão montados na cabeça de uma sonda de medição. A diferença de vapor de água calculada às duas alturas é o valor estimado para o gradiente de vapor de água da camada de difusão. Deste gradiente, o valor de PTEA, expresso em $\text{g/m}^2/\text{h}$, é calculado pelas unidades de processamento do aparelho e mostrado digitalmente. Esta estimativa só é válida dentro dos limites da camada de difusão, sendo que a espessura desta varia com a zona da pele, com a velocidade e convecções do ar, sejam livres ou forçadas. Na ausência de correntes de convecção ou de correntes de ar, o valor médio de espessura da camada de difusão é aceite como sendo de 10 mm.

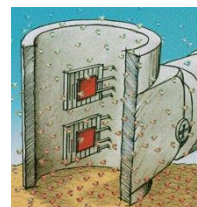
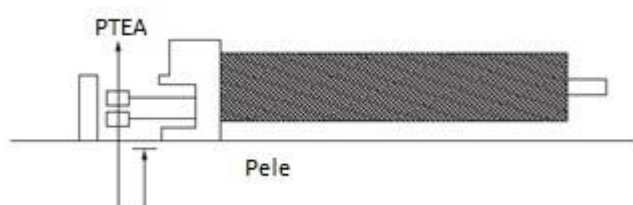


Figura 12. Esquema ilustrativo da colocação da sonda de evaporimetria à superfície da pele (à esquerda) (adaptado de Pinnagoda *et al.*, 1990⁽¹⁴⁶⁾); destaque da cabeça da sonda de evaporimetria (à direita) (adaptado de Courage + Khazaka, electronic GmbH⁽¹⁴⁷⁾).

2.1.2. Métodos experimentais

2.1.2.1. Participantes do estudo

Para este estudo foi escolhida uma amostra de conveniência de acordo com determinados critérios de inclusão e não-inclusão previamente definidos e apresentados na tabela 1. Todos os indivíduos deram o seu consentimento informado por escrito, constante no anexo 1, antes da sua inclusão no estudo. Os indivíduos eram saudáveis e não estavam sujeitos a qualquer medicação regular, à exceção de sete mulheres que tomavam anticoncepcionais orais. Os indivíduos abstiveram-se de consumir bebidas alcoólicas e cafeinadas, bem como de aplicar medicamentos tópicos com ação vasoativa e, ainda, produtos cosméticos, nas 24 horas que antecederam o estudo. O projeto experimental foi previamente submetido e aprovado pela Comissão de Ética institucional (ULHT), tendo sido respeitados os princípios da Declaração de Helsínquia e emendas posteriores à experimentação em humanos⁽¹⁴⁸⁾.

Tabela 1. Critérios de inclusão e exclusão definidos para o estudo.

Critérios de inclusão	Critérios de não-inclusão
<ul style="list-style-type: none">• 18-65 anos• Sem doença cardiovascular conhecida• Sem doença metabólica conhecida• Normotensos• Genericamente saudáveis e sem qualquer medicação regular	<ul style="list-style-type: none">• Consumo regular de tabaco• Apresentar febre nos 5 dias anteriores à participação no estudo• Toma de medicação vasoativa nas 24 horas anteriores à participação no estudo• Presença de lesões cutâneas nos dedos ou dorso dos pés ou tornozelos• Prática desportiva nas 24 horas anteriores à participação no estudo

Para o modelo humano foram definidos dois grupos de avaliação - grupo 1, composto por homens e mulheres saudáveis com idades compreendidas entre os 18 e os 30 anos ($22,1 \pm 3,7$), e grupo 2, composto por homens e mulheres saudáveis com idades compreendidas entre os 40 e os 65 anos ($50,8 \pm 7,6$). A tabela 2 apresenta as características demográficas e antropométricas da amostra estudada.

Tabela 2. Caracterização demográfica e antropométrica da amostra estudada.

Parâmetro	Grupo 1		Grupo 2	
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres
Idade				
Mínima	18	18	40	41
Máxima	28	30	61	65
IMC (kg/m²)				
Mínimo	19,4	17,4	24,2	19,9
Máximo	29,0	26,4	28,7	29,4

2.1.2.2. Testes dinâmicos

Nos humanos foram aplicados três protocolos experimentais - a elevação passiva da perna (protocolo 1), a oclusão supra-sistólica no tornozelo (protocolo 2) e a respiração de oxigénio a 100% (protocolo 3).

Todos os registos foram obtidos em sala climatizada (temperatura de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humidade relativa de 40-60%). Antes de se iniciarem os registos os indivíduos aclimatizaram-se às condições da sala, na posição de sentado, durante 30 minutos, com os pés expostos, usando vestuário leve.

Cada protocolo implicou três fases de registo - a fase de estabilização (fase I), na qual se fez um registo basal das variáveis, a fase de provocação (fase II), e a fase de recuperação (fase III), que consistiu no restabelecimento das condições iniciais. Os protocolos 2 e 3 foram realizados em primeiro lugar, mas de uma forma aleatória, sendo o protocolo 1 realizado

em último lugar por questões logísticas. Entre cada dois protocolos foi deixado um período de estabilização (*washout*) de 10 minutos. As variáveis foram registadas num membro escolhido aleatoriamente em diferentes regiões do pé, como ilustrado na figura 13. A sonda de LDF foi colocada na face inferior do segundo dedo do pé e fixada por meio de uma fita adesiva dupla (PF 105-3, Perimed, Suécia) para evitar a introdução de artefactos de movimento. A sonda de tcpO₂ foi colocada no dorso do pé, no primeiro espaço intermetatársico, após limpeza com álcool etílico a 95% (v/v). A sonda de PTEA foi colocada também no dorso do pé, na projeção da raiz do terceiro e quarto dedos. Foram escolhidas regiões distais do pé por razões de ordem teórica e técnica. Por um lado, os dedos são regiões dos pés com elevada perfusão⁽¹⁴⁹⁾, tornando-se convenientes para medir o fluxo sanguíneo e levar a cabo testes de provocação de longa duração. Por outro lado, os dedos são também regiões sujeitas a elevado grau de disfunção microvascular, bem evidente em doenças como a diabetes *mellitus*⁽¹⁵⁰⁾ e a doença arterial periférica⁽¹⁵¹⁾. Finalmente, o dorso do pé possui zonas com uma superfície suficientemente grande e aplanada para permitir a colocação das sondas de gasimetria transcutânea e de PTEA. Estas regiões de medição foram mantidas em todos os protocolos. Em cada teste foi pedido aos indivíduos que evitassem movimentar os membros inferiores.

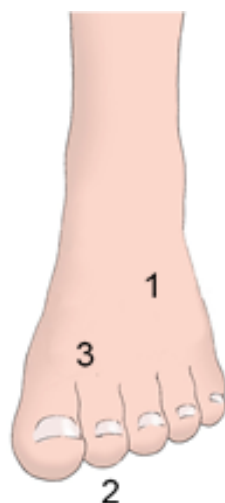


Figura 13. Esquema ilustrativo das zonas de colocação das sondas à superfície do pé (1 - sonda de PTEA, 2 - sonda de LDF, 3 - sonda de tcpO₂).

Foi utilizada uma sonda de LDF com aquecimento (*457 small angled probe*, Perimed, Suécia), representada na figura 14, acoplada a um sistema de aquisição PF 5010 que equipava o aparelho Periflux 5000 (Perimed, Suécia). A sonda apresentava um diâmetro de 10 mm, o comprimento de onda da luz laser era de 780 nm e a distância entre a fibra emissora e sensora da sonda era de 0,25 mm. Com estas características a luz laser apresenta uma capacidade de penetração entre 0,5 e 1 mm. O sinal de laser foi adquirido a uma frequência de 32 Hz (i.e., 32 amostras a cada segundo) com uma constante de aquisição temporal de 0,2.



Figura 14. Ilustração da sonda de LDF utilizada para as medições em humanos (*457 small angled probe*, Perimed, Suécia) (reproduzido a partir de Perimed⁽¹⁵²⁾).

Para o registo da pressão parcial de oxigénio, foi utilizado como gasímetro um eléctrodo duplo tcpO₂/tcpCO₂ (Radiometer, Copenhaga), acoplado ao sistema de aquisição PF 5040 (Perimed, Suécia). Para a quantificação da perda transepidérmica de água (PTEA), utilizou-se uma sonda de evaporimetria acoplada ao sistema de aquisição Tewameter TM300 (Courage & Khazaka, Colónia, Alemanha). A cabeça da sonda possui uma forma cilíndrica, com um diâmetro de 10 mm e uma altura de 20 mm, estando os sensores a uma distância de 4,5 e 10,5 mm da superfície da pele. O sinal foi adquirido a uma frequência de amostragem de 0,1 Hz (i.e., uma amostra a cada 10 segundos).

2.1.2.3. Protocolo 1 - Elevação passiva da perna^(106, 153, 154)

A manobra foi realizada a partir da posição de supinação, tendo os indivíduos estabilizado nesta posição durante 10 minutos antes do início do registo. Foi feito um registo basal de 10 minutos com ambas as pernas ao nível do coração, ao fim dos quais se elevou passivamente uma das pernas a um ângulo aproximado de 45 graus com o plano horizontal, como ilustrado na figura 15. Esta posição foi mantida por mais 10 minutos, no final dos quais a posição inicial foi reposta.



Figura 15. Esquema ilustrativo da postura adotada no protocolo de elevação passiva da perna durante a fase de provocação.

2.1.2.4. Protocolo 2 - Oclusão supra-sistólica no tornozelo⁽¹⁵⁵⁾

Os indivíduos encontravam-se na posição sentada com os pés apoiados no chão. Foi colocada uma manga de pressão (*SC12 Segmental Cuff 13 por 85 cm*, Hokanson, EUA) à volta de um dos tornozelos com o seu bordo inferior em contacto com o bordo superior dos maléolos tibiais medial e lateral, tendo permanecido durante todo o protocolo, como ilustrado na figura 16. Foi feito o registo de estabilização com 10 minutos de duração, ao fim do qual se aumentou manualmente a pressão de ar na manga por meio de uma pera de insuflação, a um ritmo de 20 mmHg por segundo até ser atingida a pressão de 200 mmHg,

mantida durante um período de 3 minutos. No fim deste período, a manga foi desinsuflada por completo, manualmente em aproximadamente 5 segundos, mantendo-se o registo por mais 10 minutos.



Figura 16. Esquema ilustrativo da postura adotada no protocolo de oclusão supra-sistólica.

2.1.2.5. Protocolo 3 - respiração de uma atmosfera de oxigénio a 100%⁽¹⁵⁶⁻¹⁵⁸⁾

Os indivíduos realizaram a manobra na posição sentada com os pés apoiados no chão. Foi feito um registo basal de 10 minutos, com o indivíduo a respirar normalmente o ar ambiente. Findo este período, aplicou-se uma máscara facial nos indivíduos (*AGA MedControl 45 Bar Oxygen Demand Valve facemask*, AGA AB, Suécia), ligada a uma botija contendo oxigénio puro (*AirLiquide*, Portugal), como ilustrado na figura 17. Foi pedido aos indivíduos que respirassem apenas pela boca. Esta máscara garantia que o ar inspirado provinha apenas da botija e não da atmosfera da sala, e que o ar expirado era eliminado apenas para a atmosfera (fração de inalação $\approx 100\%$). Após 10 minutos de respiração o indivíduo voltava a respirar a atmosfera da sala por mais 10 minutos.



Figura 17. Esquema ilustrativo da postura adotada no protocolo de respiração de oxigênio a 100% durante a fase de provocação.

2.1.2.3. Determinação do índice tornozelo-braço (ITB)

O índice tornozelo-braço (ITB) foi descrito pela primeira vez por Winsor em 1950 e foi proposto como um teste não invasivo de diagnóstico da doença arterial periférica (DAP) distal⁽¹⁵⁹⁾. Mais tarde foi descoberto que o ITB tem interesse como indicador de aterosclerose, bem como um marcador de prognóstico de doenças cardiovasculares e insuficiências funcionais diversas, mesmo na ausência de sintomas da DAP⁽¹⁶⁰⁾.

O ITB faz uso da constatação fisiológica de que a pressão arterial é mais elevada na região inferior do corpo que na região superior. A onda de pulso arterial sofre amplificação à medida que se propaga distalmente do coração, resultando num aumento progressivo da pressão sistólica e numa diminuição progressiva da pressão diastólica. Tal ocorre pela reflexão retrógrada da onda de pulso a partir de arteríolas distais resistentes, que se soma à onda anterógrada⁽¹⁵⁹⁾. Para além disso, as artérias do membro inferior sofrem remodelação morfológica, com espessamento da parede mas sem alteração do raio, o que resulta num aumento da pressão intraluminal⁽¹⁵⁹⁾.

A medição das pressões arteriais sistólica e diastólica e o cálculo do ITB foram feitos segundo as recomendações da *American Heart Association (AHA)*⁽¹⁶⁰⁾, segundo a qual, em

indivíduos assintomáticos, são considerados normais valores de ITB acima de 1,0 mas abaixo de 1,4⁽¹⁵⁹⁾. A medição da pressão arterial foi feita após um período de estabilização de 5 minutos, com os indivíduos em supinação, com a cabeça e calcanhares apoiados. A manga de pressão foi colocada aproximadamente 1 cm acima da fossa antecubital e 2 cm acima do bordo do maléolo tibial medial. Foi usado um tensiômetro digital (*Tensoval*®, Hartmann, Alemanha) em ambos os membros superiores e inferiores, duas vezes em cada membro, e sempre pela mesma ordem, começando pelo braço. Foi pedido aos indivíduos que não se movimentassem nem falassem durante as medições. O ITB de cada indivíduo foi determinado pela divisão do maior valor de pressão sistólica medida no tornozelo pelo maior valor de pressão sistólica medida no braço.

2.1.2.4. Caracterização dos protocolos experimentais – determinação de parâmetros descritivos

Cada protocolo experimental foi dividido em três fases de registo. Para o cálculo de parâmetros de caracterização de cada protocolo foi feita uma “condensação” dos sinais de LDF e de tcpO₂, correspondendo cada ponto do sinal “condensado” à média aritmética de cada intervalo de 10 segundos do sinal original. Com base na bibliografia mais relevante foram escolhidos diversos parâmetros de quantificação do fluxo sanguíneo, tcpO₂ e PTEA, apresentados nas tabelas 3 e 4.

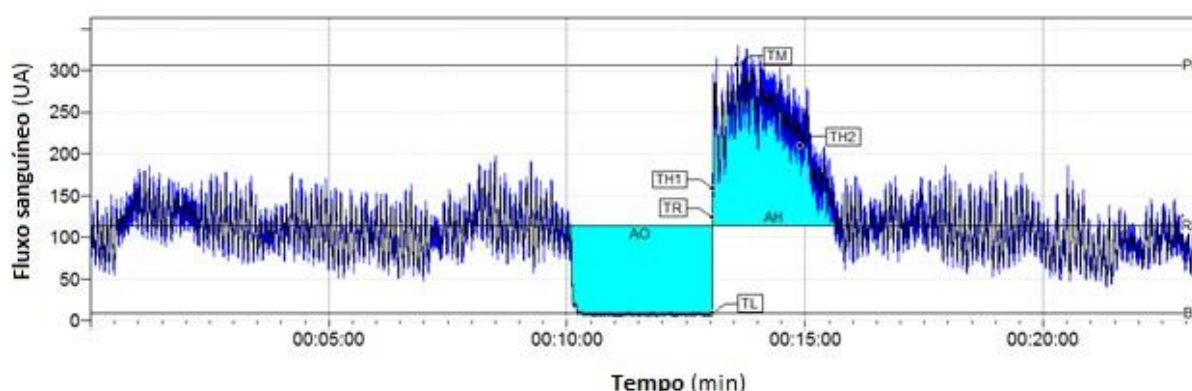


Figura 18. Registro de um sinal de LDF ilustrativo pelo software *PeriSoft for Windows* ao longo dos 23 minutos do protocolo de oclusão supra-sistólica num indivíduo (#27, masculino, 23 anos), com destaque para os parâmetros de análise.

Tabela 3. Lista de parâmetros, calculados a partir do sinal de LDF, usados para a caracterização das respostas aos protocolos de elevação passiva da perna e de oclusão supra-sistólica.

RF	Fluxo basal – a média do sinal de fluxometria durante toda a fase de estabilização (UA)
BZ	Zero biológico – a média do sinal de fluxo durante a fase de oclusão (UA)
PF	Pico de fluxo – o valor máximo de fluxo observado durante a hiperémia (UA)
RF-BZ	Variação percentual do fluxo basal para o zero biológico
BZ-PF	Variação percentual do zero biológico para o pico de fluxo
RF-PF	Variação percentual do fluxo basal para o pico de fluxo
TL	Tempo até à latência (s)
TR	Tempo até à resposta (s)
TH1	Tempo até metade do fluxo máximo antes da hiperémia (s)
TM	Tempo até ao fluxo máximo (s)
TH2	Tempo até ao fluxo máximo após a hiperémia (s)
AO	Área de oclusão – área sob a curva do período de oclusão (AU.s)
AH	Área de hiperémia – área sob a curva do período hiperémico (AU.s)
AH/AO	Rácio da área de hiperémia pela área de oclusão

Tabela 4. Lista de parâmetros, calculados a partir do sinal de tcpO₂, usados para a caracterização das respostas aos protocolos de elevação passiva da perna e de oclusão supra-sistólica.

Vd	Velocidade de decremento – taxa de variação média do tcpO ₂ (entre os minutos 10 e 14 para o protocolo de elevação passiva da perna; entre os minutos 10 e 13 para o protocolo de oclusão e entre os minutos 20 e 24 para o protocolo de respiração de oxigénio a 100% (mmHg/min)
Vi	Velocidade de incremento – taxa de variação média do tcpO ₂ (entre os minutos 20 e 24 para o protocolo de elevação passiva da perna; entre os minutos 13 e 16 min para o protocolo de oclusão e entre os minutos 10 e 14 para o protocolo de respiração de oxigénio a 100% (mmHg/min)
tcpO₂ máx	Pico de tcpO₂ – valor máximo de tcpO ₂ (apenas para o protocolo de respiração de oxigénio a 100%) (mmHg)
t-máx	Tempo até ao pico de tcpO₂ – tempo necessário para atingir o valor máximo de tcpO ₂ (apenas para o protocolo de respiração de oxigénio a 100%) (min)

2.2. Segundo objetivo: encontrar as melhores ferramentas de análise fina do sinal de LDF

Os sinais biológicos fornecem informação sobre o funcionamento de vários órgãos/sistemas de órgãos, todos eles apresentando diferentes escalas temporais. Por exemplo, a atividade neuronal opera na escala temporal dos milissegundos, os ritmos circadianos na escala das horas, os ciclos reprodutivos na escala das semanas e a remodelação óssea na escala dos meses. Pelo funcionamento integrado do organismo, cada fenómeno fisiológico interage com outros fenómenos mais rápidos e mais lentos que o seu próprio, produzindo sinais complexos, frequentemente multiescalados⁽¹⁶¹⁾. De acordo com a escala a que são analisados, os sinais biológicos podem apresentar diferentes comportamentos (ex.: não-linearidade, dependência sensível de pequenas perturbações, memória longa, variações extremas e não estacionaridade)⁽¹⁶²⁾.

De acordo com o conhecimento atual, o fluxo sanguíneo microcirculatório é explicado pela atividade de seis sistemas biológicos que, no contexto de uma análise espectral, recebem o nome de “componentes”. Cada componente está relacionada com a atividade de um determinado sistema e apresenta uma gama de frequências já identificada no humano – cardíaca (0,4-2 Hz), respiratória (0,15-0,4 Hz), miogénica (0,052-0,15 Hz), simpática (0,021-0,052 Hz) endotelial dependente de NO (0,0095-0,021 Hz) e endotelial independente de NO (0,0050-0,0095 Hz)⁽¹⁶³⁾. As componentes situadas entre os 0,4 e 2 Hz e entre os 0,15 e 0,4 Hz devem-se à transmissão à microcirculação das modificações hemodinâmicas síncronas com a frequência cardíaca⁽¹⁶⁴⁾ e frequência respiratória⁽¹⁶⁵⁾, respetivamente. A alteração nas contribuições da amplitude relativa (normalizada) das componentes cardíaca e respiratória não espelha necessariamente alterações em termos de frequência⁽¹⁶⁶⁾. A atividade miogénica apresenta uma gama de frequências bem definida, entre os 0,052 e os 0,15 Hz⁽¹⁶⁵⁾, podendo, no entanto, ser confundida pela atividade respiratória, sobretudo se as oscilações mecânicas desta atividade ocorrerem a baixa frequência⁽¹⁶⁵⁾. A componente simpática oscila entre os 0,021 e os 0,052 Hz, tendo sido proposta na sequência de registos de LDF feitos após estimulação elétrica cutânea⁽¹⁶⁷⁾. Mais tarde, com registos de LDF feitos em pele inervada e em pregas musculocutâneas desnervadas, constatou-se a presença de uma banda espectral no referido intervalo nos registos de pele intacta mas não nos registos

da prega musculocutânea⁽¹⁶⁸⁾. As bandas endoteliais foram identificadas na sequência de registos de LDF após a administração de fármacos por iontoforese. Constatou-se que a administração de acetilcolina provocava o aumento da amplitude do espectro do sinal de LDF compreendido entre os 0,0095 e os 0,021 Hz^(122, 134). Mais tarde, constatou-se que a administração de N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) diminuía a amplitude espectral entre os 0,0095 e os 0,021 Hz, mas não a amplitude entre 0,0095 e 0,0050 Hz. Por outro lado, a administração de aspirina não afetava nenhuma das regiões espectrais, deduzindo-se que essa região espectral diria respeito a uma atividade endotelial independente de NO, provavelmente relacionada com os fatores de hiperpolarização derivado do endotélio⁽¹²²⁾.

Como os mecanismos de regulação do fluxo sanguíneos são complexos na sua natureza mas também na forma como interagem e se modulam mutuamente⁽⁷⁵⁾, surge a necessidade de avaliar a contribuição individual de cada componente para o sinal global. Por outro lado, dado que cada componente do sinal de LDF apresenta uma gama de frequências de atividade única, o próprio sinal, bem como cada componente, apresenta multiescalaridade. Com o objetivo de avaliar diferentes propriedades do sinal de LDF tendo em conta esta multiescalaridade, propõe-se a utilização de ferramentas que levam a cabo análises a diferentes escalas – a análise de flutuação retificada (*detrended fluctuation analysis* – DFA) e a análise de entropia à multiescala (*multiscale entropy analysis* – MSE).

Uma propriedade dos sinais biológicos que tem sido alvo de estudo é a fractalidade. Sinais considerados fractais apresentam invariância à dilatação no tempo ou no espaço. A figura 19 representa um processo ondulatório aleatório cuja estrutura se mantém a diferentes escalas. De um modo geral, os sinais fractais podem ser unidimensionais ou multidimensionais, bem como discretos ou contínuos em relação ao tempo e em relação à amplitude⁽¹⁶⁹⁾. O sinal de LDF foi já caracterizado quanto à sua fractalidade^(170, 171) e entropia^(172, 173). No entanto, a caracterização destas propriedades nas componentes do sinal de LDF é ainda escassa.

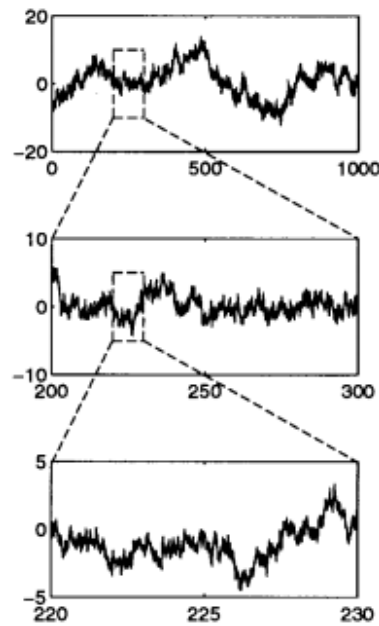


Figura 19. Registo ondulatório de um processo aleatório estatisticamente invariante à escala, representado em três escalas diferentes. Observa-se a manutenção da estrutura do registo independentemente da escala (adaptado de Wornell, 1998⁽¹⁶⁹⁾).

A par da fractalidade, outra propriedade dos sinais biológicos que tem ganho relevo nos últimos anos é a sua imprevisibilidade ou complexidade. Esta imprevisibilidade pode ser estimada por ferramentas matemáticas que quantificam a entropia do sinal. Existem diferentes parâmetros de quantificação da entropia, mas apenas a MSE permite avaliar a entropia a diferentes escalas temporais. A MSE tem encontrado aplicações na análise de vários tipos de sinais biológicos, incluindo a monitorização da frequência cardíaca⁽¹⁷⁴⁾, inclusive a fetal⁽¹⁷⁵⁾, de sinais de eletroencefalografia na doença de Alzheimer⁽¹⁷⁶⁾ e na avaliação da profundidade anestésica⁽¹⁷⁷⁾, na classificação de sinais de eletromiografia em doenças neuromusculares⁽¹⁷⁸⁾, análise da frequência cardíaca para prever a mortalidade hospitalar⁽¹⁷⁹⁾, e análise dos intervalos do batimento cardíaco e do fluxo sanguíneo para caracterizar dimensões psicológicas em indivíduos sem patologia⁽¹⁸⁰⁾.

2.2.1. Transformada rápida de Fourier (FFT)⁽¹⁸¹⁾

Em resumo, a transformada de Fourier (*Fourier transform* – FT) de uma função contínua aperiódica $f(t)$ é expressa por:

$$X(f) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t)e^{-j2\pi fnt} dt \quad [22]$$

onde $x(t)$ pode ser recuperada de $X(f)$ como

$$x(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} X(f)e^{j2\pi fnt} df \quad [23]$$

onde n representa a amostra a analisar, $x(t)$ o valor do sinal no tempo t , f a frequência considerada, e $X(f)$ a quantidade de frequência k no sinal (amplitude e fase).

A transformada discreta de Fourier (*discrete Fourier transform* – DFT) utiliza janelas temporais finitas da função original para extrair a contribuição do sinal a cada frequência. Uma forma mais rápida de aplicar a DFT é a transformada rápida de Fourier (*fast Fourier transform* – FFT), que necessita de um número bastante menor de amostras. A FT transforma uma série temporal num domínio de frequência sem reter qualquer informação temporal, o que constitui uma desvantagem para a análise de sinais biológicos.

2.2.2. Transformada de ondeleta (WT)⁽¹⁸²⁾

Uma ondeleta (*wavelet*) é definida como uma onda pequena ou oscilação que decai rapidamente. Morlet considerou as ondeletas como uma família de funções construídas de traduções e dilatações de uma única função chamada “ondeleta mãe” $\psi(t)$. Essas funções são definidas por:

$$\psi_{a,b}(t) = \frac{1}{\sqrt{|a|}} \psi\left(\frac{t-b}{a}\right), a, b \in R, a \neq 0 \quad [24]$$

Em que o parâmetro a é o parâmetro de escalonamento, e mede o grau de compressão, e o parâmetro b é o parâmetro de tradução que determina a localização temporal da ondeleta. Se $|a| < 1$, então a ondeleta da equação acima é a versão comprimida da “ondeleta mãe” e corresponde principalmente a frequências mais altas. Por outro lado, quando $|a| > 1$, então $\psi_{a,b}(t)$ tem uma maior largura temporal e corresponde a frequências mais baixas.

2.2.3. Análise de Flutuação Retificada (DFA)⁽¹⁸³⁾

A análise de flutuação retificada (*Detrended Fluctuation Analysis – DFA*) é um método desenvolvido por Peng *et al.* (1994) e fornece um parâmetro quantitativo, o expoente de escalonamento α , que representa as propriedades de correlação de uma série temporal. O procedimento seguinte é usado para calcular o expoente α :

Em primeiro lugar, para uma dada série temporal de pontos $x_i, i=1,...,N$, obtém-se:

$$y(k) = \sum_{i=1}^k [x_i - \bar{x}], \quad [25]$$

onde

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad [26]$$

corresponde à média da série de valores x_i .

De seguida, a série somada cumulativamente $y(k)$ é dividida em caixas não sobrepostas de igual dimensão, n . Em cada caixa é ajustada $y(k)$, usando um ajustamento linear de mínimos quadrados, que representa a tendência local naquela caixa.

A coordenada y da linha ajustada em cada caixa é denotada por $y_n(k)$. Ao sinal somado cumulativamente $y(k)$ é subtraída a tendência local $y_n(k)$, em cada caixa de dimensão n .

Para um dado comprimento de caixa n , a flutuação da raiz quadrática média (rqm) para este sinal somado cumulativamente e subtraído de tendência é:

$$F(n) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{k=1}^N [y(k) - y_n(k)]^2} \quad [27]$$

Repetindo este cálculo para todos os tamanhos de caixa obtém-se uma relação entre $F(n)$ e o comprimento de caixa n . Para sinais fractais, auto-similares, $F(n)$ comporta-se como uma lei de potência de n , e os dados podem ser descritos por:

$$F(n) \stackrel{d}{\equiv} Cn^\alpha \quad [28]$$

onde C é a constante de proporcionalidade e o símbolo $\stackrel{d}{\equiv}$ representa que as propriedades estatísticas de ambos os lados da equação anterior são idênticos apenas em distribuição.

O coeficiente de escalonamento α representa as propriedades de correlação do sinal e de $[F(n)]$ para $\log n$, $\log[F(n)] = \log C + \alpha \log n$.

A classificação de um sinal fractal pela DFA é possível com base no valor de α ⁽¹⁸⁴⁾. A $0 < \alpha \leq 1$ corresponde o ruído Gaussiano fracional (rGf). Um valor de $\alpha=0,5$ indica que o sinal é completamente não correlacionado (ruído branco – *white noise*). Quando $\alpha > 0,5$ o sinal indica correlações de curto alcance. Correlações de longo alcance estão presentes quando $0,5 < \alpha \leq 1$. No caso de $\alpha > 1$, a série temporal é análoga de outra classe de sinal temporal fractal, o movimento Browniano fracional (mBf). O valor de $\alpha=1,5$ corresponde a correlações de longo-alcance que não estão necessariamente relacionadas com processos estocásticos e podem refletir correlações determinísticas.

A vantagem da DFA sobre métodos convencionais é que permite a detecção de correlações de longo alcance incorporadas numa série temporal aparentemente não-estacionária, e evita também a detecção espúria de aparentes correlações de longo alcance que são artefactos da não-estacionaridade⁽¹⁸⁵⁾. Os expoentes alfa da DFA têm sido usados para distinguir condições fisiológicas de condições fisiopatológicas, mostrando alguma utilidade como ferramenta diagnóstica⁽¹⁷⁰⁾.

2.2.4. Análise de entropia à multiescala (MSE)⁽¹⁸⁶⁾

Costa *et al.*⁽¹⁸⁶⁾ propuseram o conceito de entropia à multiescala (*multiscale entropy*), que permite análises de séries fisiológicas temporais curtas e ruidosas. A MSE consiste na obtenção de valores de entropia, que são uma medida de incerteza, ao longo de várias escalas. Para este propósito, dada uma série temporal x_i , $i=1,...,N$, é construída uma série temporal *coarse-grained* consecutiva $y^{(\tau)}$:

$$y_j^{(\tau)} = \frac{1}{\tau} \sum_{i=(j-1)\tau+1}^{j\tau} x_i \quad [29]$$

onde τ representa o fator de escala e $1 \leq j \leq N/\tau$. A entropia da amostra (SampEn) de cada *coarse-grained* é então computada. SampEn(m, r, N) é o logaritmo natural negativo da probabilidade condicional de um conjunto de dados de comprimento N , tendo-se repetido com uma tolerância r por m pontos, se irá repetir também por $m+1$ pontos, sem permitir auto-semelhanças:

$$\text{SampEn}(m, r, N) = -\ln \frac{A^m(r)}{B^m(r)} \quad [30]$$

onde $A^m(r)$ é a probabilidade de duas sequências se corresponderem por $m+1$ pontos e $B^m(r)$ a probabilidade de duas sequências se corresponderem por m pontos.

Portanto, uma série temporal contendo muitos padrões repetitivos será mais regular e previsível, e menor será o seu valor de SampEn. Quanto mais aleatória a série temporal, ou seja, quanto mais desordenada, maior será o seu valor de SampEn.

2.2.5. Estratégia para o processamento do sinal de LDF e análise estatística

Todas as ferramentas de análise fina do sinal de LDF foram implementadas no software MATLAB 2014b (MathWorks Inc, EUA). A primeira ferramenta aplicada no modelo humano foi a WT, a partir da qual se procedeu à determinação da contribuição de cada

componente do sinal de LDF usando como referência os intervalos de frequência atrás descritos.

No modelo animal, uma vez que a posição espectral das suas componentes era desconhecida, e com o intuito de aumentar a robustez na sua determinação, os sinais de LDF foram decompostos pela FFT e pela WT. Ambas as ferramentas criaram registros espectrais das componentes de atividade do sinal, que consistem na representação gráfica da evolução da amplitude do sinal transformado em função da frequência, no caso da FFT, ou do período, no caso da WT. As bandas de atividade foram identificadas visualmente e os seus períodos-limite foram marcados manualmente. As representações espectrais obtidas por ambas as transformadas foram sobrepostas para melhor observação dos valores-limite.

Por forma a encontrar-se, no caso da WT, uma expressão de conversão dos valores de período em valores de frequência começou-se por criar um sinal artificial com 57600 amostras (o mesmo número de amostras que um sinal de LDF de 30 minutos de duração adquirido à frequência de 32 Hz), composto pela sobreposição de vários sinais trigonométricos “seno” de diferentes frequências, como mostra a seguinte equação:

$$S(x) = \sum_{i=1}^7 \text{seno}(2\pi c_i x)$$

$$c_1 = \frac{2}{32}, c_2 = \frac{1}{32}, c_3 = \frac{0.145}{32}, c_4 = \frac{0.052}{32}, c_5 = \frac{0.021}{32}, c_6 = \frac{0.0095}{32}, c_7 = \frac{0.005}{32} \quad [31]$$

em que $S(x)$ representa a função do sinal artificial, e os valores de c_1 a c_7 representam os valores das frequências fundamentais, em Hz. De seguida usou-se a WT para decompor o sinal “seno” nas suas componentes principais. Cada componente possui uma determinada atividade, avaliada por um coeficiente, numa determinada gama de escalas. A representação do coeficiente de atividade a cada gama de escalas ao longo da extensão do sinal denomina-se escalograma, como ilustrado na figura 20, no caso do sinal “seno”.

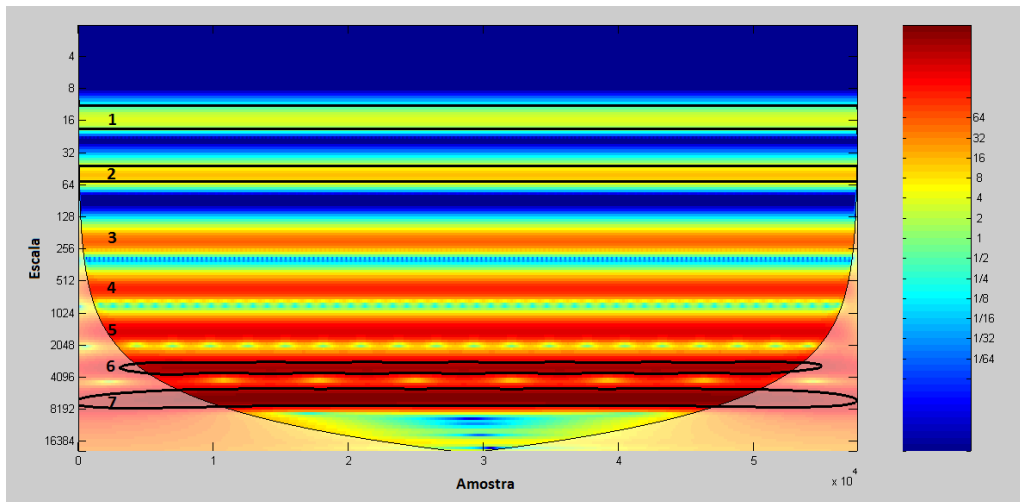


Figura 20. Escalograma do sinal artificial “seno” que representa a atividade de cada frequência fundamental (1 – 2 Hz, 2 – 0,6 Hz, 3 – 0,145 Hz, 4 – 0,052 Hz, 5 – 0,021 Hz, 6 – 0,0095 Hz, 7 – 0,0050 Hz) com 57600 amostras. A amplitude é dada visualmente pela intensidade cromática.

A atividade de cada componente ao longo de uma série temporal do sinal pode ser também representada tridimensionalmente, como mostrado na figura 21. Neste caso, ao invés da escala, utilizou-se o período para representar o intervalo espectral de atividade de cada componente.

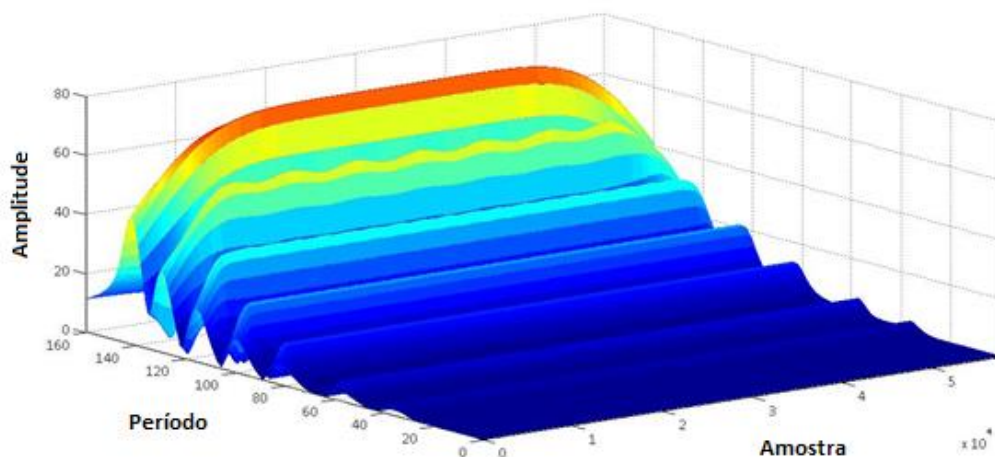


Figura 21. Representação tridimensional da amplitude do sinal artificial “seno” em função do período e do número de amostras.

A representação tridimensional da figura 21 pode ser transformada numa representação bidimensional, fazendo-se uma média de cada período ao longo da série temporal, como mostra a figura 22. Esta representação, o já referido periodograma, é análoga do espectro da FFT.

Tabela 5. Correspondência entre os valores de período e frequência fundamentais do sinal artificial “seno”.

Período (p)	36	57	82	100	115	129	140
Frequência (f, Hz)	2	0,6	0,145	0,052	0,021	0,0095	0,005

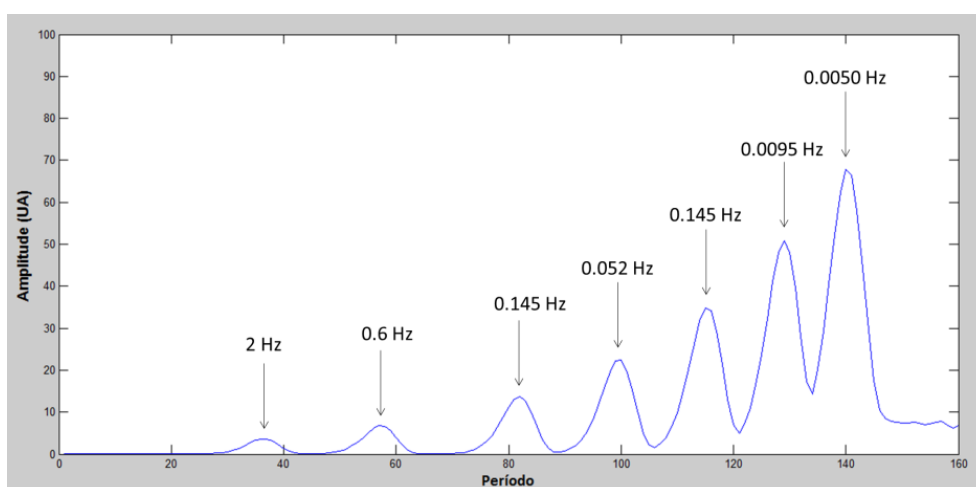


Figura 22. Periodograma do sinal artificial “seno”. Cada máximo local corresponde a uma frequência fundamental do sinal.

De seguida foram encontrados os períodos correspondentes aos valores máximos de amplitude de cada pico, como mostrado na tabela 5. Fazendo-se uma representação gráfica dos valores de frequências f , previamente conhecidas, em função dos períodos p , descobertos manualmente, obteve-se a relação exponencial mostrada na figura 23 e representada pela equação 32.

$$f=16,101e^{-0,058p} \quad [32]$$

A equação 32 foi então usada para converter os valores de período em valores de frequência.

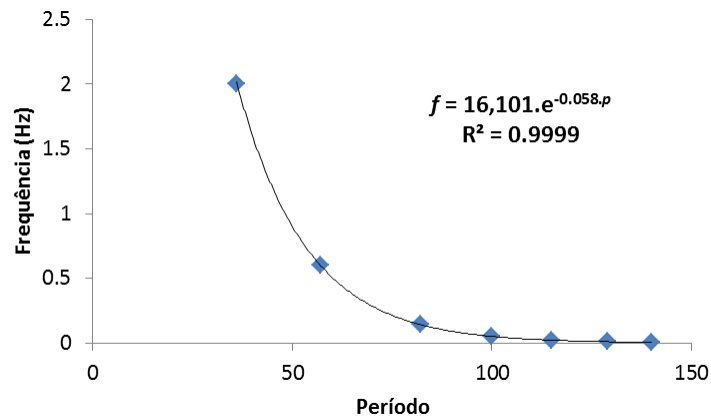


Figura 23. Relação exponencial entre os valores de período e frequência de um sinal.

A partir dos intervalos de frequência das componentes do sinal de LDF, a amplitude de cada componente foi determinada como o valor absoluto do número de onda, sendo de seguida normalizada, através da divisão (rácio) da área sob a curva da onda “seno” de cada componente pela área sob a curva das ondas “seno” de todas as componentes.

O expoente α da DFA e o índice de complexidade (IC) da MSE foram determinados para cada segmento (fase) do sinal de LDF original e para cada componente de WT utilizando “toolboxes” do MATLAB. O algoritmo de DFA foi implementado de tal modo que quer o sinal de LDF quer as suas componentes foram divididas em 100 caixas de 5000 amostras cada. O algoritmo de MSE foi implementado com os parâmetros $\tau=36$, $m=2$ e $r=0,15 \times DP$, onde DP é o desvio padrão da série temporal.

A estatística descritiva foi obtida com Microsoft Excel 2010 (versão 14.0, EUA). Todos os testes estatísticos restantes foram executados no software IBM SPSS Statistics (versão 21, EUA). Para a estatística descritiva, cada amostra dos sinais de PTEA, LDF e tcpO₂ correspondeu à média destes sinais a cada 10 segundos. Para efeitos de comparação estatística de fases e de grupos foi considerada a média os últimos 5 minutos de cada fase no caso dos sinais de PTEA, LDF e tcpO₂. No caso da WT, a atividade de cada componente do sinal de LDF em cada fase foi calculada tendo em conta os limites do cone de influência do escalograma, tendo sido excluídos os segmentos do sinal que se encontrassem fora do mesmo.

A distribuição não-normal das variáveis e parâmetros escolhidos para análise foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para as comparações entre as diferentes fases de cada protocolo foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras emparelhadas. Para as comparações entre sexos e para as comparações entre protocolos diferentes foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes. As correlações entre diferentes variáveis e/ou parâmetros foram determinadas pelo teste de correlação de Spearman. Em todos os testes estatísticos foi adotado um nível de significância de 0,05.

2.3. Terceiro objetivo: desenvolver um modelo animal que permita testar os instrumentos até aqui desenvolvidos, olhando mais aprofundadamente, se possível, para os fenómenos em causa

No segundo objetivo elencámos ferramentas para a análise fina do sinal de LDF obtido em indivíduos humanos saudáveis. Surgiu, portanto, a necessidade de se aplicar as ferramentas escolhidas num contexto fisiopatológico, por forma a testar a sua utilidade. O contexto fisiopatológico escolhido foi a isquémia. Por questões de ordem ética e deontológica, este estudo foi levado a cabo em modelos animais.

Tanto quanto seja do nosso conhecimento não existem ainda modelos animais para o estudo da microcirculação periférica com a técnica de LDF utilizando a inalação de oxigénio como provocação, seja em condições fisiológicas seja em condições de isquémia-reperusão do membro inferior. Existem vários modelos que utilizam a isquémia unilateral do membro posterior e avaliam a recuperação com a técnica de imagem por laser Doppler⁽¹⁸⁷⁻¹⁸⁹⁾. O único modelo que utilizou o LDF para avaliar a isquémia do membro inferior focou-se na prega cutânea⁽¹⁹⁰⁾. Existe, portanto, a necessidade de se explorar a microcirculação num modelo de isquémia do membro posterior, com registos de LDF feitos no próprio membro.

Este estudo foi conduzido no *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1034*, em Pessac, França. Foram utilizados dois grupos de murganhos para a realização de diferentes protocolos experimentais:

- um grupo controlo, composto por 16 murganhos C57 black 6 (C57BL/6) jovens e saudáveis, que não sofreu qualquer intervenção cirúrgica – 8 murganhos com 8 semanas de idade e 8 murganhos com 27 semanas de idade (idade média de 17 semanas)

- um grupo de 9 murganhos C57BL/6 com 16 semanas de idade submetidos a cirurgia para indução de isquémia do membro posterior (*hindlimb ischemia* - *HLI*).

Todas as técnicas e métodos utilizados respeitaram as Boas Práticas em Experimentação Animal em vigor na União Europeia⁽¹⁹¹⁾, sendo previamente aprovadas pela Comissão de Ética Institucional (INSERM U1034).

2.3.1. Animais

Foram utilizados 16 murganhos (*Mus musculus*) C57BL/6 machos, com uma idade média de 18 semanas (8 murganhos com 8 semanas e 8 murganhos com 27 semanas). A nove desses murganhos foi induzida cirurgicamente isquémia unilateral do membro posterior, enquanto aos oito restantes não foi feita qualquer intervenção. Os murganhos foram criados no biotério do *INSERM U1034*, alimentados *ad libitum*, expostos a ciclos de luz/escuridão de 12 h num ambiente com $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura e $40 \pm 20\%$ de humidade relativa.

2.3.2. Tecnologias de medição

2.3.2.1. Fluxometria por laser Doppler (LDF)

O fluxo sanguíneo foi medido usando as técnicas de LDF e de LDI. Para a medição por LDF foram usados dois módulos PF5010 do aparelho PeriFlux 5000, acoplados a duas sondas 407 (*small straight probe*, Perimed, Suécia) acoplada a um disco fixador (*PH 07-5 Small Tape Fixated Probe Holder*, Perimed, Suécia) que por sua vez se fixava à zona de medição por meio de uma fita adesiva dupla (PF 105-3, Perimed, Suécia). A sonda apresenta um diâmetro

de 10 mm, o comprimento de onda da luz laser era de 780 nm e a distância entre as fibras emissora e recetora era de 0,25 mm. O sinal foi adquirido a uma frequência de amostragem de 32 Hz com uma constante temporal de 0,05.

2.3.2.2. Imagem por laser Doppler (LDI)

As análises de LDI foram realizadas no final da manobra de respiração de oxigénio, com o murganho ainda anestesiado, numa sala com condições de temperatura e humidade de 22 ± 1 °C e $40 \pm 20\%$, respetivamente. Foi utilizado um dispositivo *moorLDI Laser Doppler Imager* (Moor Instruments, Reino Unido). O murganho foi colocado na posição de decúbito ventral numa placa apropriada para a leitura por laser orientando-se os membros posteriores de tal modo que a face inferior da pata ficasse orientada superiormente, por forma a poder receber o feixe de luz do aparelho. O fluxo sanguíneo regional de cada pata, expresso em unidades arbitrárias (UA), foi determinado pela quantificação da intensidade cromática da imagem produzida.

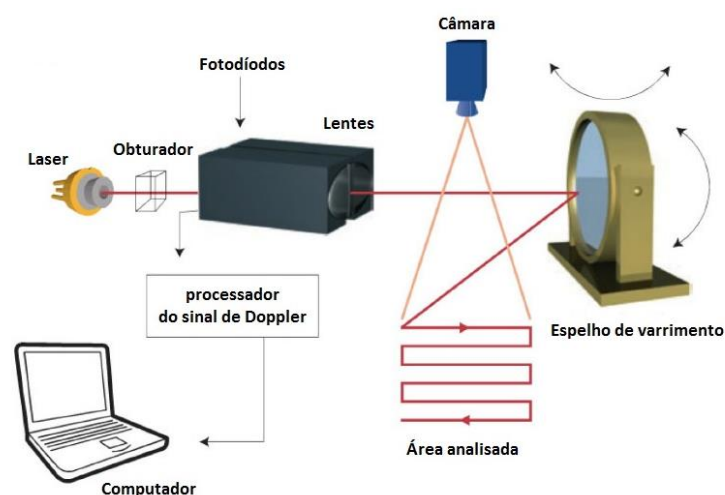


Figura 24. Esquema ilustrativo do trajeto da luz laser numa medição à pele por LDI (adaptado de Moor Instruments⁽¹⁹²⁾).

2.3.3. Testes dinâmicos

2.3.3.1. Respiração de uma atmosfera saturada em oxigénio

Os murganhos foram anestesiados com uma administração intraperitoneal de quetamina (125 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Uma vez anestesiados foram colocados em pronação numa placa de plástico aquecida à temperatura de 36°C. A cabeça dos murganhos foi colocada num respiradouro cilíndrico embutido na placa, e os membros inferiores foram lateralizados. As sondas de LDF foram coladas na zona central da face inferior de cada pata, adjacentes ao limite posterior das almofadas plantares, como ilustrado na figura 25. Ao fim de 10 minutos de estabilização deram-se início as medições de LDF.

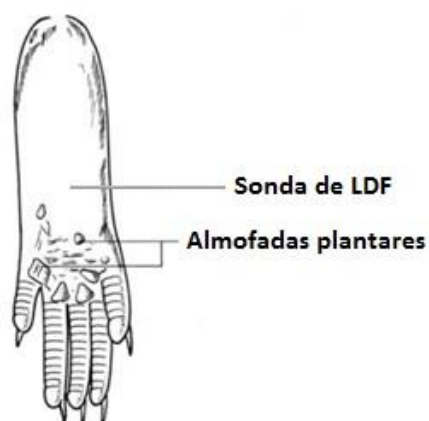


Figura 25. Face inferior do membro posterior do murganho, com destaque para as almofadas plantares (Adaptado de Cook, 1965⁽⁵⁸⁾).

Foi feito um registo de estabilização de 10 minutos no qual os animais respiraram a atmosfera da sala (fase I - estabilização), no final dos quais era inserido um tubo no respiradouro da placa, ligado a uma botija contendo oxigénio puro (AirLiquide, França), e aberta a válvula de escoamento da botija para o respiradouro. Os murganhos respiraram a atmosfera saturada em oxigénio (fração de inalação $\approx 100\%$) durante 10 minutos (fase II - provocação), no final dos quais a torneira foi fechada e os animais voltaram a respirar a atmosfera da sala (fase III - recuperação).

Os murganhos do grupo controlo foram sujeitos a este protocolo apenas uma vez. Os murganhos do modelo de isquémia do membro posterior foram acompanhados ao longo de

dias, tendo realizado este protocolo nos seguintes dias: 0 (dia anterior à cirurgia), e 4, 6, 9, 12, 15 e 18 após a cirurgia.

2.3.3.2. Indução da isquemia do membro posterior

Foi induzida isquemia no membro posterior esquerdo dos animais pela remoção cirúrgica da artéria e veia femorais superficiais, como descrito por Niiyama *et al.*⁽¹⁹³⁾. Os animais foram colocados em supinação numa placa operatória com o focinho adaptado ao respiradouro embutido na própria placa, e foi feita a indução anestésica com 5% de isoflurano em 100% de oxigênio. Uma vez anestesiados reduziu-se a concentração de isoflurano para 3% em 100% de oxigênio durante o período restante da cirurgia. Foi removido o pelo do quadrante abdominal inferior esquerdo do animal pela aplicação breve (1 min) de creme depilatório. O excesso de creme e pelo foram removidos da zona da cirurgia. Foi feita uma incisão longitudinal de 2 cm com o auxílio de um bisturi e tesoura cirúrgicos, desde o joelho até à região medial da coxa. O campo cirúrgico manteve-se aberto com fórceps. O tecido conjuntivo foi removido segurando-o com um fórceps e removendo-o com um segundo. Uma vez expostos, a artéria e veia femorais superficiais e o nervo femoral foram ligados com fio cirúrgico e excisados em todo o seu trajeto a partir das suas extremidades com uma tesoura. A incisão foi fechada com fio cirúrgico.

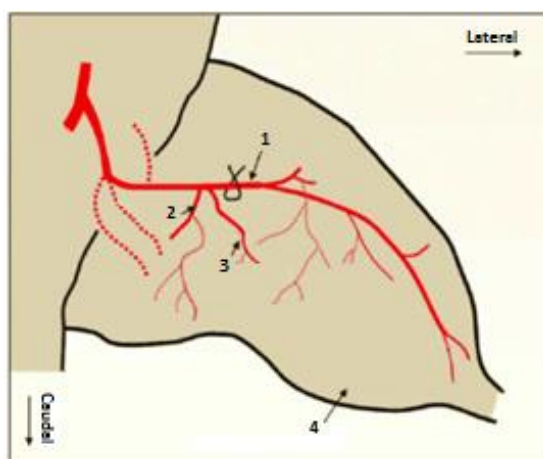


Figura 26. Diagrama esquemático ilustrando os vasos principais do membro posterior do murgancho (1 – artéria femoral, 2 – artéria femoral profunda, 3 – artéria epigástrica, 4 – músculo gastrocnêmio). (Adaptado de Jia *et al.*, 2011⁽¹⁹⁴⁾).

Capítulo III : Resultados e Discussão

3.1. Primeiro objetivo: desenvolver metodologias que permitam obter parâmetros funcionais microcirculatórios *in vivo* em indivíduos saudáveis de diferentes idades, e caracterizar eventuais alterações relacionadas com o envelhecimento

3.1.1. *Elevação passiva da perna*

A manobra de elevação passiva da perna a 45° é usada, clinicamente, como uma forma de prever a responsividade de indivíduos à administração de fluidos⁽¹⁰⁶⁾. Esta alteração postural causa uma transferência gravitacional de sangue do compartimento circulatório periférico para o compartimento circulatório central, reduzindo a perfusão periférica. Esta provocação é ilustrada, portanto, como uma “autoadministração de fluidos”. Estima-se que a elevação de ambas as pernas provoque a transferência de aproximadamente 150 mL de sangue⁽¹⁹⁵⁾, pelo que a elevação de uma perna apenas deverá provocar a mobilização de um volume significativamente inferior.

Este protocolo foi realizado com os indivíduos em supinação, posição esta na qual a volémia sofre distribuição por todo o corpo, diminuindo a perfusão basal do membro inferior face à posição de sentado⁽¹⁹⁶⁾. A transferência gravitacional de sangue aquando da elevação da perna provoca uma redução de perfusão no membro inferior, que explica a redução significativa dos valores de LDF e tcpO₂ entre as fases I e II ($p < 0,001$ em ambos os casos). Por seu lado a PTEA aumentou de forma não significativa. Ao retomar a posição inicial observou-se um aumento rápido e intenso da perfusão, resposta esta que é compatível com uma hiperémia⁽¹⁰⁵⁾. Dado a provocação não ter consistido numa oclusão arterial, a hiperémia observada não se poderá classificar formalmente de “hiperémia reativa”. Ainda assim, tendo em conta as manifestações apresentadas por alguns indivíduos

(parestesia e arrefecimento do membro inferior), admitiu-se a possibilidade de uma compressão parcial da artéria femoral durante a elevação com esta angulação.

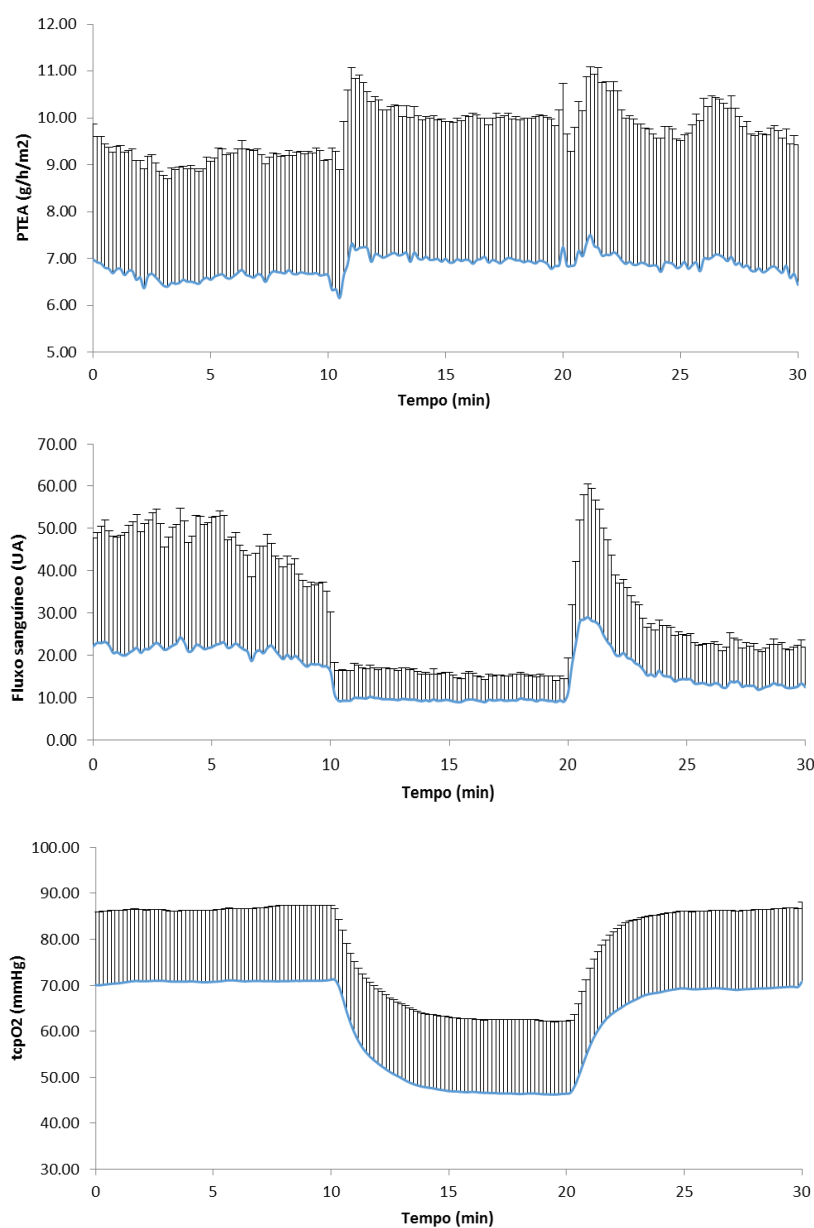


Figura 27. Evolução dos valores médios (+ desvio padrão) de PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição no protocolo de elevação passiva da perna (N=65). A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a elevação dos 11 aos 20 minutos, e a recuperação entre os 21 e os 30 minutos.

Tabela 6. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de elevação passiva da perna (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para todos os indivíduos Comparação estatística com a fase I ($p < 0,05$, * - estatisticamente significativo).

		Grupos 1 e 2 (N=65)	p
PTEA	Fase I	6,6 \pm 2,5	-
	Fase II	6,9 \pm 3,0	0,266
	Fase III	6,8 \pm 3,0	0,648
	Δ II-I (%)	6,0 \pm 28,7	-
	Δ III-II (%)	4,8 \pm 39,5	-
LDF	Fase I	20,1 \pm 21,8	-
	Fase II	9,3 \pm 5,6	<0,001*
	Fase III	12,9 \pm 9,0	<0,001*
	Δ II-I (%)	-38,1 \pm 21,9	-
	Δ III-II (%)	47,2 \pm 82,6	-
	RF	21,8 \pm 24,9	-
	BZ	9,5 \pm 6,0	-
	PF	52,1 \pm 47,4	-
	RF-BZ (%)	-44,6 \pm 22,1	-
	BZ-PF (%)	668,4 \pm 700,2	-
	RF-PF (%)	318,2 \pm 342,6	-
	TL	4,4 \pm 4,5	-
	TR	7,4 \pm 7,0	-
	TH1	22,5 \pm 33,8	-
	TM	52,5 \pm 61,0	-
	TH2	63,5 \pm 63,7	-
	AO	5741,3 \pm 8000,0	-
	AH	1583,4 \pm 2206,2	-
	AH/AO	0,6 \pm 1,0	-
tcpO₂	Fase I	70,9 \pm 16,2	-
	Fase II	46,5 \pm 15,9	<0,001*
	Fase III	69,3 \pm 17,0	0,003*
	Δ II-I (%)	-34,4 \pm 17,6	-
	Δ III-II (%)	-2,6 \pm 6,0	-
	Vd (mmHg/min)	-6,0 \pm 3,2	-
	Vi (mmHg/min)	5,7 \pm 3,0	-

Foi encontrada uma correlação negativa entre o valor de tcpO_2 da fase de estabilização e a velocidade de decremento ($\text{Rho}=-0,490$, $p<0,001$), mas uma correlação positiva com a velocidade de velocidade de incremento ($\text{Rho}=0,512$, $p<0,001$). Estes resultados sugerem que um tecido com um maior nível basal de tcpO_2 sofre uma redução mais lenta desta variável e um incremento mais rápido, isto é, perde menos viabilidade durante o período isquêmico e recupera mais rapidamente do mesmo. Por outro lado, foi encontrada uma relação positiva entre o valor de fluxo durante a fase de estabilização e o valor máximo de fluxo durante a resposta hiperêmica (PF) ($\text{Rho}=0,423$, $p<0,001$). Já entre o nível basal de fluxo e a área hiperêmica a relação encontrada foi negativa, mas sem significância. Estes resultados sugerem que quanto maior o fluxo basal mais exuberante será a resposta hiperêmica. Em resumo, estes resultados sugerem que os valores basais destas variáveis possuem um valor preditivo quanto à resposta fisiológica registrada neste protocolo.

Tabela 7. Coeficiente Rho da correlação de Spearman entre parâmetros do protocolo de elevação passiva da perna ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

	Rho	p
tcpO₂ fase I vs Vd	-0,490	<0,001*
tcpO₂ fase I vs Vi	0,512	<0,001*
tcpO₂ fase I vs AH	0,294	0,023*
LDF fase I vs PF	0,423	0,001*
LDF fase I vs AH	-0,207	0,112

3.1.1.1. Comparação de grupos

A média das pressões arteriais registradas nos indivíduos jovens foi de 121,0 / 77,4 mm Hg no braço e de 139,8 / 76,3 mm Hg ao nível do tornozelo. Já os indivíduos mais velhos apresentaram como média das pressões arteriais 121,8/80,1 mm Hg no braço e 144,9/82,3

mm Hg no tornozelo. Verificaram-se, portanto, valores mais elevados de pressão arterial nos indivíduos mais velhos, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa.

Todos os indivíduos apresentaram valores de ITB dentro da normalidade. Em cada grupo as mulheres apresentaram valores de ITB inferiores aos dos homens, diferenças estas que não se revelaram significativas. Os indivíduos jovens apresentaram um valor médio de 1,16 enquanto que os sêniores um valor médio de 1,20, mas não foram encontradas diferenças estatísticas entre os valores de ITB dos indivíduos dos dois grupos. Estas diferenças do ITB relacionadas com o sexo e com a idade estão de acordo com resultados já apresentados⁽¹⁹⁷⁾.

Tabela 8. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) da pressão arterial sistólica (PS) e diastólica (PD), medidas no braço e tornozelo, e de ITB, nos indivíduos dos grupos 1 e 2 (N=65). Comparação estatística entre grupos ($p < 0,05$).

Pressão arterial (mm Hg)	Grupo 1			Grupo 2			p (grupo 1 vs grupo 2)
	Feminino	Masculino	Total	Feminino	Masculino	Total	
PS braço	116,6 \pm 11,5	125,6 \pm 5,3	121,0 \pm 10,0	122,8 \pm 18,5	120,9 \pm 12,0	121,8 \pm 15,2	0,628
PD braço	78,1 \pm 9,4	77,5 \pm 4,9	77,4 \pm 7,2	78,5 \pm 9,4	81,6 \pm 8,9	80,1 \pm 9,1	0,341
PS tornozelo	132,6 \pm 13,6	146,9 \pm 11,7	139,8 \pm 14,4	139,4 \pm 16,1	149,9 \pm 12,4	144,9 \pm 15,0	0,225
PD tornozelo	74,0 \pm 9,0	78,6 \pm 8,4	76,3 \pm 8,9	74,1 \pm 9,3	82,3 \pm 9,0	78,3 \pm 9,9	0,425
ITB	1,15 \pm 0,07	1,17 \pm 0,09	1,16 \pm 0,06	1,14 \pm 0,09	1,25 \pm 0,10	1,20 \pm 0,11	0,182

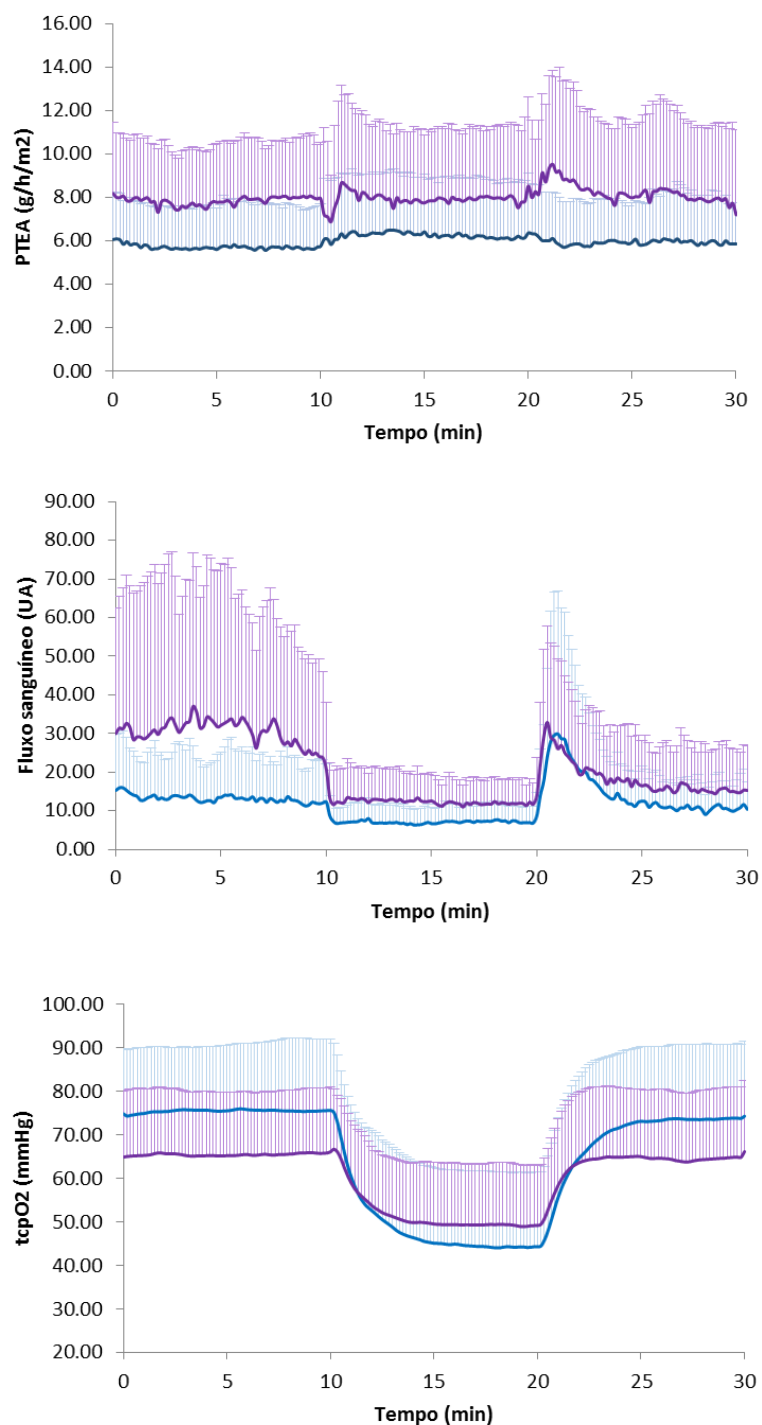


Figura 28. Evolução dos valores médios (+ desvio padrão) da PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição nos grupos 1 (azul) e 2 (roxo) no protocolo de elevação passiva da perna. A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a elevação dos 11 aos 20 minutos, e a recuperação entre os 21 e os 30 minutos.

Tabela 9. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de elevação passiva da perna (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para os indivíduos dos grupos 1 e 2. Comparação estatística entre grupos ($p < 0,05$, * - estatisticamente significativo).

		Grupo 1 (N=35)	Grupo 2 (N=30)	valor p
PTEA	Fase I	5,7 \pm 2,0	7,9 \pm 2,7	0,001*
	Fase II	6,2 \pm 2,6	7,9 \pm 3,3	0,033*
	Fase III	5,9 \pm 2,1	8,0 \pm 3,5	0,024*
	Δ II-I (%)	10,6 \pm 33,1	-0,1 \pm 21,0	0,196
	Δ III-II (%)	6,6 \pm 50,2	2,3 \pm 18,6	0,177
LDF	Fase I	12,7 \pm 11,1	28,9 \pm 27,8	0,002*
	Fase II	7,2 \pm 4,3	11,9 \pm 5,9	0,001*
	Fase III	10,8 \pm 6,7	15,4 \pm 10,8	0,061
	Δ II-I (%)	-34,4 \pm 19,4	-42,6 \pm 24,1	0,093
	Δ III-II (%)	63,5 \pm 97,9	27,5 \pm 54,8	0,018*
	RF	14,2 \pm 12,2	31,4 \pm 12,4	0,003*
	BZ	7,1 \pm 4,1	12,4 \pm 6,8	<0,001*
	PF	59,8 \pm 44,9	42,6 \pm 49,6	0,399
	RF-BZ (%)	-39,6 \pm 18,4	-50,9 \pm 24,8	0,048*
	BZ-PF (%)	897,5 \pm 837,7	382,0 \pm 298,7	0,002*
	RF-PF (%)	430,5 \pm 405,0	172,7 \pm 148,3	<0,001*
	TL	4,5 \pm 4,7	4,2 \pm 4,3	0,975
	TR	6,4 \pm 5,1	8,8 \pm 9,0	0,660
	TH1	21,6 \pm 26,5	23,8 \pm 42,6	0,409
	TM	48,3 \pm 42,7	58,3 \pm 80,7	0,863
	TH2	59,4 \pm 46,7	69,6 \pm 84,2	0,886
	AO	5034,8 \pm 8445,5	6977,7 \pm 7192,0	0,062
	AH	1864,5 \pm 2370,1	1091,4 \pm 1838,8	0,004*
	AH/AO	0,9 \pm 1,0	0,2 \pm 0,8	0,001*
tcpO₂	Fase I	75,5 \pm 15,9	65,5 \pm 14,5	0,012*
	Fase II	44,3 \pm 17,1	49,2 \pm 14,0	0,136
	Fase III	73,4 \pm 17,0	64,3 \pm 15,8	0,073
	Δ II-I (%)	-42,0 \pm 18,2	-25,2 \pm 11,6	<0,001*
	Δ III-II (%)	-2,9 \pm 5,5	-2,2 \pm 6,8	0,531
	Vd (mmHg/min)	-7,7 \pm 3,0	-4,1 \pm 2,2	<0,001*
	Vi (mmHg/min)	7,2 \pm 2,8	3,9 \pm 2,1	<0,001*

Foram encontradas diversas diferenças estatísticas em diversas variáveis e parâmetros entre os dois grupos de indivíduos. Os indivíduos mais velhos apresentaram consistentemente valores de PTEA mais elevados durante todo o protocolo (fase I – $p=0,001$, fase II – $p=0,033$, fase III – $p=0,024$). Estes resultados não estão de acordo com a literatura, que refere, de um modo geral, uma independência desta variável em relação à idade⁽¹⁴⁶⁾. Alguns estudos notaram que, em indivíduos acima dos 60 anos de idade, os valores de PTEA se encontravam diminuídos face a indivíduos mais jovens⁽¹⁹⁸⁻²⁰⁰⁾. No entanto, a maior parte destes estudos, usou áreas anatómicas diferentes da considerada no presente estudo, pelo que é plausível que, os nossos resultados espelhem de forma fiel eventuais alterações na função de “barreira” epidérmica entre indivíduos de diferentes idades.

O fluxo sanguíneo notou-se ser significativamente mais elevado ($p=0,002$) nos indivíduos mais velhos na fase de estabilização, de acordo com resultados já publicados⁽²⁰¹⁾. Tal diferença pode atribuir-se à modificação da atividade dos mecanismos de regulação da perfusão cutânea com a idade, nomeadamente, à perda de mecanismos vasoconstritores por sobre-regulação de recetores α -adrenérgicos⁽²⁰²⁻²⁰⁴⁾. Os indivíduos mais velhos apresentaram um valor de fluxo mais elevado durante a provocação ($p=0,001$), mas sofreram igualmente, um maior decréscimo em termos de fluxo basal, como observado nos valores de $\Delta II-I$ e de RF-BZ ($p=0,093$ e $p=0,048$, respetivamente). A resposta hiperémica apresentada pelos indivíduos mais velhos foi menos exuberante que a dos indivíduos mais jovens, uma vez que apresentaram valores de RF-PF, BZ-PF e AH significativamente inferiores ($p<0,001$, $p=0,002$ e $p=0,004$, respetivamente).

Os valores basais de $tcpO_2$ foram significativamente mais baixos nos indivíduos mais velhos ($p=0,012$). Como mencionado na secção 2.1.1.2. do Capítulo 2, os valores de $tcpO_2$ medidos são valores registados após o aquecimento artificial pelo próprio elétrodo. Um dos fatores que influencia a $tcpO_2$ é o fluxo sanguíneo que, durante o aquecimento, se encontra aumentado. O aquecimento acima dos 42 °C constitui um estímulo nódico que provoca uma resposta inflamatória neurogénica mediada pelas fibras C-polimodais⁽²⁰⁵⁾, acompanhando-se de vasodilatação. Portanto, os valores de $tcpO_2$ acabam por monitorizar a pressão parcial transcutânea de oxigénio durante a inflamação neurogénica e não em condições basais⁽²⁰⁵⁾. Sabe-se que esta resposta inflamatória neurogénica diminui com a idade⁽²⁰⁶⁾, pelo que se

supõe que a observação de níveis de tcpO₂ mais baixos em indivíduos mais velhos seja explicada pela menor intensidade desta resposta inflamatória.

Não foram encontradas diferenças na tcpO₂ durante a fase de provocação, mas notou-se uma taxa de variação (Δ II-I) significativamente maior nos indivíduos jovens ($p=0,001$). De igual modo, a velocidade de decremento da tcpO₂ foi significativamente mais elevada nos indivíduos jovens ($p<0,001$). Estes resultados da taxa de variação da tcpO₂ não concordam com os da taxa de variação do fluxo sanguíneo, ou seja, os indivíduos jovens apresentaram um menor decréscimo de fluxo, mas um maior decréscimo da tcpO₂ face aos indivíduos mais velhos. Este aparente desacordo reforça a noção de que os sinais de LDF e de tcpO₂ refletem diferentes fenómenos fisiológicos⁽²⁰¹⁾. Durante o aquecimento a 44 °C a região da pele situada abaixo do sensor de gasimetria está a sob vasodilatação e, como tal, a taxa de variação da tcpO₂ deveria seguir, em termos de magnitude, a taxa de variação do fluxo sanguíneo. Durante a fase de elevação o membro inferior apresenta menor perfusão pelos motivos enunciados acima. Como tal, durante esta fase os valores de tcpO₂ deverão espelhar, de uma forma indireta, a taxa de consumo de oxigénio pela pele, que se sabe diminuir com a idade⁽²⁰⁷⁾. Desta forma torna-se lógico que, quer a taxa de variação quer a velocidade de decremento, sejam maiores no grupo dos indivíduos jovens. A velocidade de incremento também foi significativamente maior no grupo dos indivíduos jovens ($p<0,001$), o que sugere uma maior velocidade de reperfusão neste grupo.

3.1.1.2. Comparação de sexos

Foram encontrados valores de PTEA significativamente mais elevados nos homens em todas as fases do protocolo (estabilização – $p=0,001$, provocação – $p=0,007$, recuperação – $p=0,005$), o que está de acordo com resultados já publicados⁽²⁰⁸⁾. No entanto, a influência do sexo nos valores de PTEA é controversa, existindo vários outros estudos que não encontraram relação entre as duas variáveis^(209, 210). Foi encontrado um fluxo sanguíneo mais elevado nos homens em todas as fases (estabilização – $p=0,003$, provocação – $p=0,005$, recuperação – $p=0,002$), estando estes resultados de acordo com resultados previamente publicados⁽²¹¹⁾. Por outro lado, verificou-se que a resposta

hiperémica foi equiparável entre os sexos, apresentando as mulheres uma resposta inicial de maior duração, como evidenciado no valor significativamente mais elevado de TH2 ($p=0,013$). As mulheres apresentaram valores de tcpO₂ mais elevados em todas as fases, mas sem significância estatística. Não foram encontradas diferenças nos valores da velocidade de decremento e incremento, o que sugere que ambos os sexos produzem alterações equiparáveis nos valores de tcpO₂.

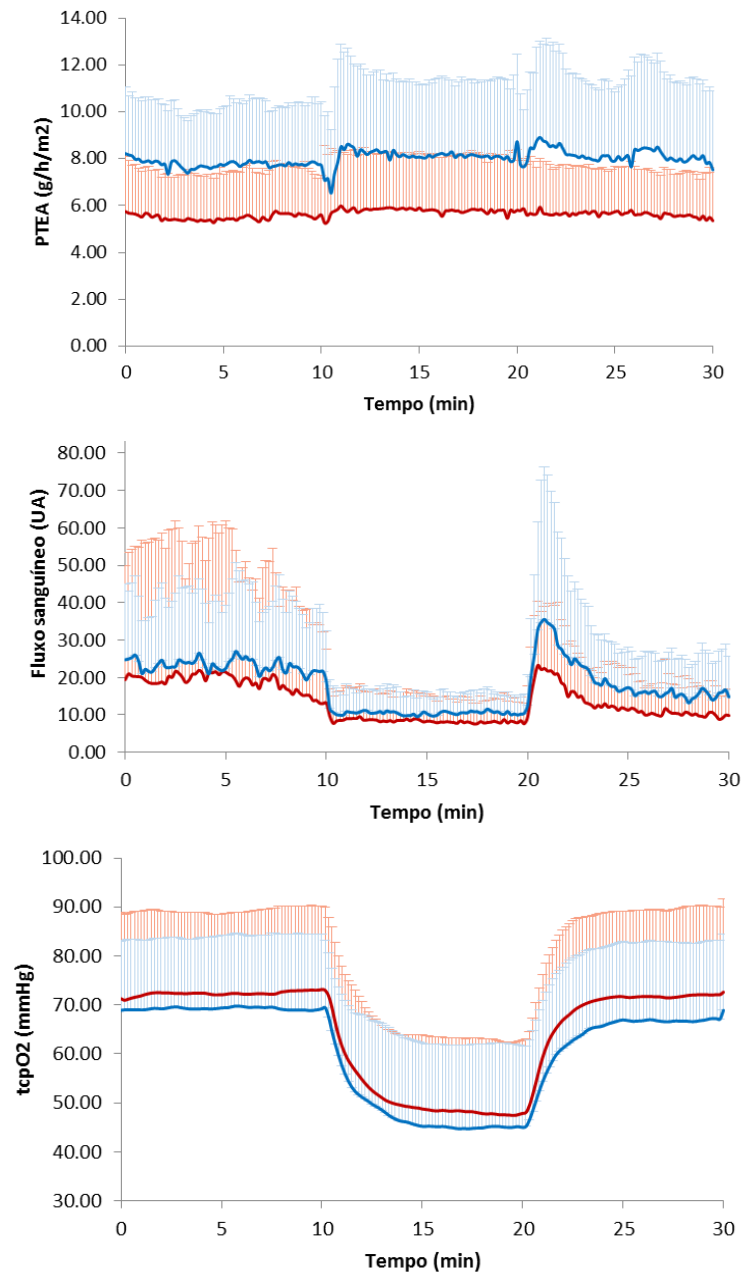


Figura 29. Evolução dos valores médios (mais desvio padrão) da PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição nos indivíduos de sexo feminino (vermelho) e masculino (azul). A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a elevação dos 11 aos 20 minutos, e a recuperação entre os 21 e os 30 minutos.

Tabela 10. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de elevação passiva da perna (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para os indivíduos do sexo feminino e masculino. Comparação estatística entre sexos ($p < 0,05$, * - estatisticamente significativo).

		Feminino (n=33)	Masculino (n=32)	valor p
PTEA	Fase I	5,5 \pm 2,0	7,8 \pm 2,6	0,001*
	Fase II	5,8 \pm 2,4	8,1 \pm 3,2	0,007*
	Fase III	5,6 \pm 1,8	8,1 \pm 3,4	0,005*
	Δ II-I (%)	6,5 \pm 31,5	5,5 \pm 26,2	0,978
	Δ III-II (%)	5,4 \pm 39,3	4,1 \pm 40,2	0,938
LDF	Fase I	17,3 \pm 26,0	22,9 \pm 16,6	0,003*
	Fase II	8,1 \pm 6,0	10,6 \pm 4,8	0,005*
	Fase III	10,3 \pm 7,6	15,5 \pm 9,6	0,002*
	Δ II-I (%)	-33,5 \pm 23,5	-42,7 \pm 19,5	0,086
	Δ III-II (%)	45,0 \pm 95,2	49,3 \pm 69,3	0,428
	RF	20,4 \pm 31,5	23,2 \pm 16,6	0,010*
	BZ	8,6 \pm 6,8	10,3 \pm 5,1	0,020*
	PF	43,7 \pm 44,8	60,2 \pm 49,2	0,098
	RF-BZ	-41,9 \pm 24,2	-47,3 \pm 19,7	0,240
	BZ-PF	757,1 \pm 863,8	582,5 \pm 493,1	1,000
	RF-PF	405,0 \pm 452,6	236,9 \pm 158,9	0,314
	TL	4,7 \pm 4,6	4,1 \pm 4,5	0,690
	TR	7,6 \pm 8,0	7,2 \pm 6,0	0,850
	TH1	30,0 \pm 46,5	15,6 \pm 11,1	0,379
	TM	71,9 \pm 81,8	34,3 \pm 19,4	0,058
	TH2	84,2 \pm 83,2	44,1 \pm 27,1	0,036*
	AO	4448,2 \pm 8530,1	6900,6 \pm 7451,0	0,013*
	AH	1394,1 \pm 1500,8	1753,1 \pm 2704,3	0,739
	AH/AO	0,8 \pm 1,2	0,4 \pm 0,7	0,067
tcpO₂	Fase I	72,6 \pm 17,1	69,3 \pm 15,0	0,541
	Fase II	48,1 \pm 14,9	45,0 \pm 16,9	0,568
	Fase III	71,8 \pm 17,9	66,8 \pm 16,0	0,347
	Δ II-I (%)	-33,6 \pm 14,5	-35,1 \pm 20,4	0,995
	Δ III-II (%)	-1,3 \pm 4,8	-3,8 \pm 6,9	0,424
	Vd (mmHg/min)	-5,9 \pm 2,8	-6,2 \pm 3,6	0,638
	Vi (mmHg/min)	5,8 \pm 2,8	5,5 \pm 3,2	0,587

3.1.2. Oclusão supra-sistólica

A oclusão supra-sistólica é uma manobra clássica para avaliar a reatividade endotelial, isto é, a produção de substâncias vasoativas pelo endotélio. No entanto, dado que os vários sistemas de regulação da perfusão se influenciam mutuamente, é necessária prudência na análise de resultados. Na realidade, no lugar de reatividade endotelial o termo mais correto a ser utilizado é “reatividade microvascular”, ou seja, a capacidade de vasodilatação. O membro superior é largamente preferido sobre o inferior para este tipo de procedimento experimental^(110, 212), sendo considerado por muitos como um *gold standard* da metodologia⁽⁵⁹⁾. O membro inferior, apesar de menos utilizado, tem sido também alvo de vários estudos^(132, 133, 213, 214).

No teste de oclusão supra-sistólica provoca-se temporariamente a compressão de artérias e regista-se a resposta vascular à remoção dessa compressão. A resposta típica de indivíduos saudáveis consiste no atingimento de um valor máximo de fluxo (“pico”) ao fim de poucos segundos, que diminui até se manter por alguns minutos (“resposta hiperémica”)⁽²¹⁵⁾. O valor máximo de fluxo reflete o seu aumento súbito após a remoção da compressão e pode ser considerado um indicador do aumento da tensão de cisalhamento na parede vascular^(216, 217). A fase hiperémica que se segue a este valor máximo é mais prolongada e reflete a “carência de perfusão” do tecido⁽²¹⁵⁾, podendo ser considerado um índice de reperfusão. A hiperémia pós-oclusiva tem vindo a ser explicada pela acumulação de vasodilatadores produzidos durante a oclusão, como a adenosina⁽²¹⁸⁾, a libertação de vasodilatadores em resposta ao aumento da tensão de cisalhamento imediatamente após à remoção da oclusão, como prostaglandinas^(217, 219), o relaxamento do músculo liso dos vasos em resposta à redução de pressão transmural nos vasos distais à zona de compressão⁽²²⁰⁾. Estudos recentes suportam este último mecanismo, sugerindo que a hiperémia pós-pico parece dever-se ao aumento da atividade miogénica⁽²²¹⁾.

O principal aspeto negativo do protocolo de oclusão supra-sistólica é a sua falta de padronização, dado a sua resposta ser influenciada por vários fatores, como a zona e tempo de oclusão, a forma de expressão de resultados (valores não processados versus processados), a idade, o sexo, e a fase do ciclo menstrual^(215, 222). A dor ou desconforto

associados a esta manobra são também um aspeto importante a ser considerado, quer no delineamento do próprio protocolo, quer na interpretação de resultados. Por forma a minimizar o desconforto do indivíduo, e por produzir respostas comparáveis a períodos de oclusão superiores, foi então escolhida uma duração de oclusão de 3 minutos.

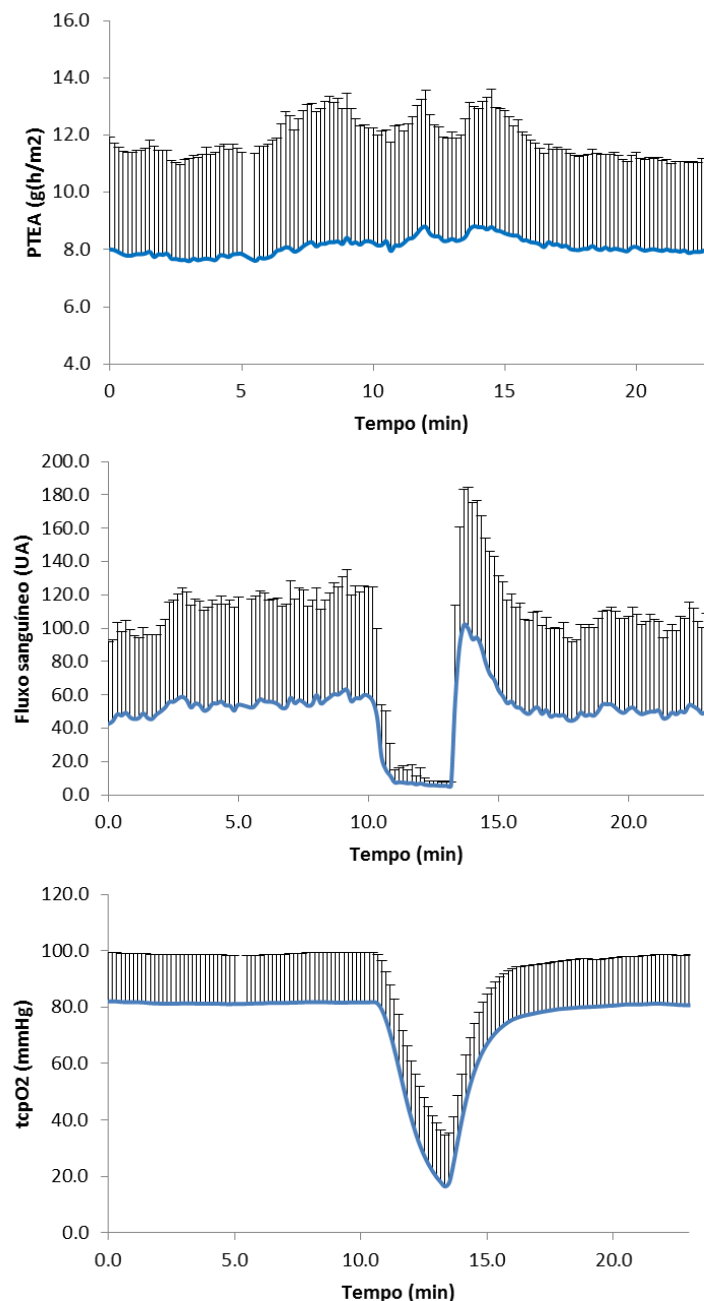


Figura 30. Evolução dos valores médios (+ desvio padrão) de PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição (N=65) no protocolo de oclusão supra-sistólica. A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a elevação dos 11 aos 20 minutos, e a recuperação entre os 21 e os 30 minutos.

Tabela 11. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de oclusão supra-sistólica (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para todos os indivíduos. Comparação estatística com a fase I ($p < 0,05$, * - estatisticamente significativo).

		Grupos 1 e 2 (n=65)	p
PTEA	Fase I	8,1 \pm 4,2	-
	Fase II	8,7 \pm 4,5	0,053
	Fase III	8,2 \pm 3,3	0,086
	Δ II-I (%)	9,7 \pm 36,8	-
	Δ III-II (%)	4,5 \pm 24,0	-
LDF	Fase I	61,0 \pm 65,5	-
	Fase II	11,0 \pm 7,5	<0,001*
	Fase III	55,0 \pm 57,8	0,016*
	Δ II-I (%)	-63,3 \pm 28,3	-
	Δ III-II (%)	7,9 \pm 70,1	-
	RF	58,6 \pm 59,7	-
	BZ	6,2 \pm 2,8	-
	PF	182,1 \pm 110,7	-
	RF-BZ	-76,3 \pm 21,3	-
	BZ-PF	3005,5 \pm 1598,6	-
	RF-PF	435,5 \pm 330,2	-
	TL	2,3 \pm 1,5	-
	TR	4,6 \pm 4,3	-
	TH1	13,4 \pm 36,4	-
	TM	65,8 \pm 130,8	-
	TH2	79,7 \pm 130,3	-
	AO	8315,0 \pm 9326,6	-
	AH	6116,5 \pm 8068,3	-
	AH/AO	2,5 \pm 10,2	-
tcpO₂	Fase I	81,6 \pm 17,4	-
	Fase II	46,9 \pm 16,6	<0,001*
	Fase III	80,7 \pm 17,1	0,089
	Δ II-I (%)	-42,4 \pm 15,7	-
	Δ III-II (%)	-0,9 \pm 4,2	-
	Vd (mmHg/min)	-21,5 \pm 7,6	-
	Vi (mmHg/min)	19,7 \pm 8,1	-

A compressão pneumática da região acima do tornozelo terá provocado uma oclusão arterial, levando a uma redução significativa da perfusão do pé, dadas pela redução significativa do fluxo sanguíneo ($p < 0,001$) e do tcpO₂ ($p < 0,001$). O fluxo sofreu uma redução média de 76,3% a partir da fase de estabilização, atingindo um valor médio de 11 UA durante a oclusão e não um “zero absoluto”. O valor obtido denomina-se “zero biológico”

(*biological zero* – BZ) e parece ter diversas causas. Estudos em tecido excisado⁽²²³⁾ e em cadáver⁽²²⁴⁾ sugerem que o BZ se deve ao movimento browniano das hemácias aprisionadas, bem como à atividade de outros constituintes do tecido vivo, como a atividade da parede vascular, folículos pilosos e glândulas sudoríparas⁽²²⁵⁾, movimentos de estruturas tecidulares e macromoléculas dos espaços intersticiais⁽¹³⁷⁾, à não interrupção total da perfusão e, até mesmo ao próprio ruído elétrico do aparelho⁽²²⁶⁾. Os valores de tcpO₂ decresceram em média 42.4% em relação à fase de estabilização e à velocidade média de 21,5 mm Hg/min. A velocidade de decremento da tcpO₂ reflete a taxa de consumo cutâneo de oxigénio^(227, 228). De facto, pode ser convertida na própria taxa de consumo pela multiplicação pelo coeficiente de dissolução de oxigénio à temperatura da sonda⁽¹⁴⁴⁾. Esta velocidade de consumo reflete não só a respiração das células da epiderme mas também a de células inflamatórias que infiltram a derme^(229, 230). Durante a oclusão foi ainda detetado um aumento dos valores de PTEA, ainda que sem significância estatística.

Após a descompressão, os valores de tcpO₂ aumentaram à Vi média de 19,7 mmHg/min, valor este muito próximo do da Vd. Não foram encontradas diferenças significativas entre os valores de PTEA, fluxo e de tcpO₂ registados das fases de estabilização e recuperação, sugerindo uma recuperação funcional das condições basais de perfusão.

Por forma a avaliar se os valores basais das variáveis permitiam prever a sua evolução ao longo do protocolo, foi feita uma correlação de Spearman entre estes e determinados parâmetros funcionais. Foi encontrada uma correlação negativa entre o nível basal de tcpO₂ e a velocidade de decremento ($Rho = -0,688$, $p < 0,001$), mas uma correlação positiva com a velocidade de incremento ($Rho = 0,612$, $p < 0,001$). Estes resultados sugerem que um tecido com um maior nível de tcpO₂ sofre uma redução mais lenta de O₂ e um incremento mais rápido, isto é, sofre menos com a isquémia e recupera mais rapidamente da mesma. Por outro lado, foram encontradas relações positivas entre o nível de fluxo basal com o valor máximo de fluxo durante a resposta hiperémica ($Rho = 0,763$, $p < 0,001$), bem como com a área hiperémica ($Rho = 0,350$, $p = 0,05$). Estes resultados sugerem que quanto maior o fluxo basal mais exuberante será a resposta hiperémica. Em resumo, estes resultados de correlações realçam a importância dos valores basais das variáveis medidas para a previsão do desfecho do protocolo.

Tabela 12. Coeficiente Rho da correlação de Spearman entre parâmetros do protocolo de oclusão supra-sistólica ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

	Rho	p
tcpO₂ fase I vs Vd	-0,688	<0,001*
tcpO₂ fase I vs Vi	0,612	<0,001*
tcpO₂ fase I vs AH	-0,260	0,039*
LDF fase I vs PF	0,763	<0,001*
LDF fase I vs AH	0,350	0,05*

3.1.2.1. Comparação por grupo

Os valores da velocidade de decremento foram consistentemente mais elevados que os de incremento nos dois grupos. Assumindo que a velocidade de decremento reflete de forma direta a taxa de consumo de oxigénio pela pele e que a velocidade de incremento se relaciona diretamente com a velocidade de reperfusão, estes resultados sugerem que a velocidade de extração de oxigénio pelos tecidos é superior à velocidade de reposição aos mesmos durante a reperfusão. Por outro lado, ambos os valores se apresentaram consistentemente mais elevados no grupo 1 do que no grupo 2, o que sugere que indivíduos jovens apresentam uma maior taxa de consumo cutâneo de oxigénio bem como uma maior velocidade de reperfusão pós-isquémia. Estes resultados reforçam aqueles encontrados para o protocolo de elevação passiva da perna, sugerindo ambos que a taxa de consumo de oxigénio é dependente da idade, como já mencionado na literatura⁽²⁰⁷⁾. Para além disso, não se detetaram diferenças nas variáveis entre as fases de estabilização e de recuperação, sugerindo uma recuperação funcional nos dois grupos nas presentes condições experimentais.

O grupo 2 revelou consistentemente valores de PTEA e fluxo sanguíneo mais elevados que os do grupo 1, juntamente com valores mais baixos de tcpO₂, tal como encontrado e justificado no protocolo de elevação passiva da perna. Por outro lado, verificou-se que na fase de recuperação o nível de tcpO₂ foi mais baixo nos indivíduos mais velhos, sugerindo uma diminuição na capacidade de perfusão distal pós-isquémia, apesar da ausência de diferenças estatisticamente significativas.

A respeito da hiperémia reativa o parâmetro RF-PF apresentou valores significativamente maiores no grupo 1 ($p=0,039$), sugerindo uma maior exuberância da resposta hiperémica. O parâmetro TH2 apresentou valores significativamente maiores no grupo 2 ($p=0,040$), o que sugere que a descida da perfusão após atingimento do pico de fluxo é mais lenta em indivíduos mais velhos.

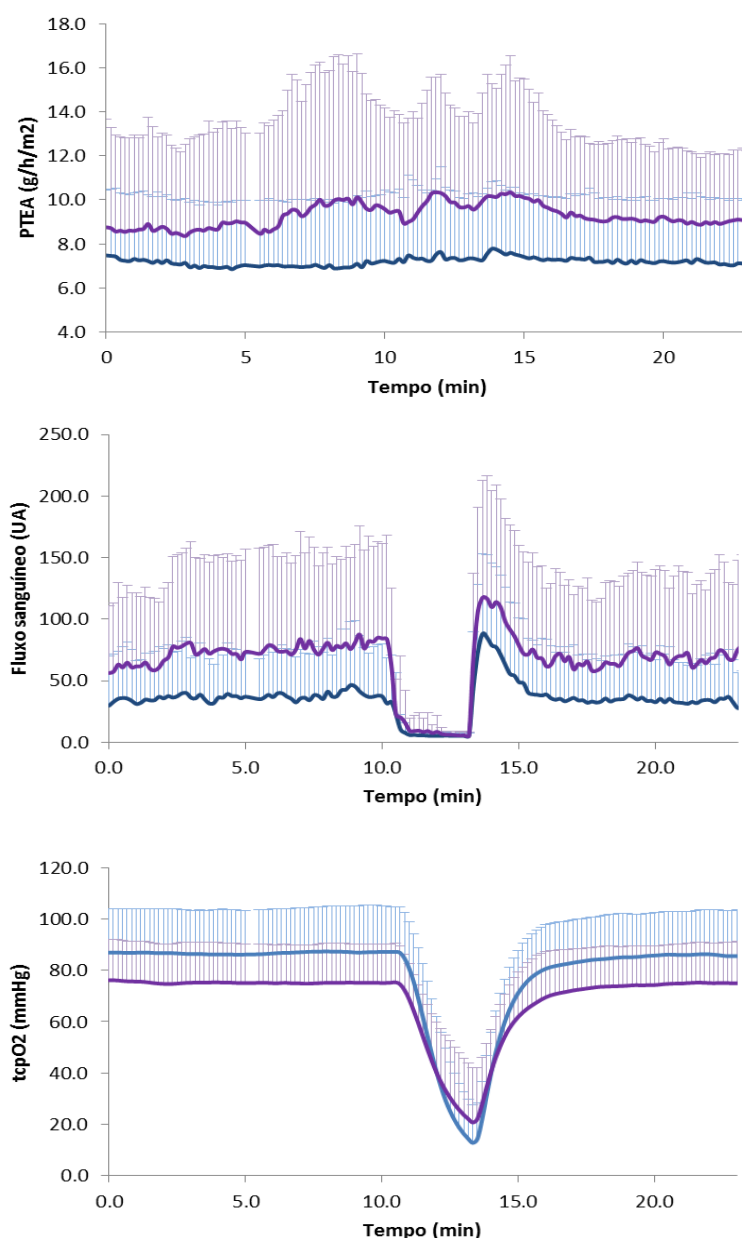


Figura 31. Evolução dos valores médios (+ desvio padrão) da PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição nos grupos 1 (azul) e 2 (roxo) no protocolo de oclusão de supra-sistólica. A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a oclusão dos 11 aos 13 minutos, e a recuperação entre os 14 e os 23 minutos.

Tabela 13. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de oclusão supra-sistólica (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para os indivíduos dos grupos 1 e 2. Comparação estatística entre grupos ($p < 0,05$, * - estatisticamente significativo).

		Grupo 1 (N=35)	Grupo 2 (N=30)	valor p
PTEA	Fase I	7,0 \pm 2,9	9,6 \pm 5,2	0,217
	Fase II	7,9 \pm 4,5	9,7 \pm 4,4	0,048*
	Fase III	7,5 \pm 3,3	9,0 \pm 3,2	0,084
	Δ II-I (%)	13,2 \pm 45,6	5,0 \pm 19,5	0,776
	Δ III-II (%)	9,5 \pm 27,8	-2,3 \pm 15,8	0,366
LDF	Fase I	47,2 \pm 53,8	77,7 \pm 74,9	0,086
	Fase II	9,4 \pm 4,1	13,0 \pm 9,9	0,167
	Fase III	43,0 \pm 50,3	69,4 \pm 63,7	0,019*
	Δ II-I (%)	-59,1 \pm 28,9	-68,5 \pm 27,1	0,100
	Δ III-II (%)	-1,0 \pm 42,1	18,6 \pm 93,2	0,845
	RF	45,1 \pm 48,0	75,5 \pm 69,0	0,116
	BZ	5,8 \pm 2,3	6,7 \pm 3,3	0,372
	PF	172,4 \pm 118,3	194,3 \pm 101,4	0,203
	RF-BZ	-74,6 \pm 18,8	-78,4 \pm 24,3	0,109
	BZ-PF	2902,7 \pm 1638,7	3130,4 \pm 1569,1	0,300
	RF-PF	485,2 \pm 302,9	373,3 \pm 357,2	0,039*
	TL	2,4 \pm 1,3	2,1 \pm 1,7	0,171
	TR	4,6 \pm 4,0	4,7 \pm 4,7	0,409
	TH1	8,6 \pm 10,6	19,4 \pm 53,3	0,353
	TM	23,7 \pm 26,9	116,8 \pm 181,2	0,050
	TH2	38,3 \pm 35,2	129,9 \pm 179,1	0,040*
	AO	6304,6 \pm 8065,0	10827,9 \pm 10298,1	0,062
	AH	6274,1 \pm 8280,5	5919,6 \pm 7941,5	0,619
	AH/AO	1,4 \pm 1,3	3,9 \pm 15,7	0,191
tcpO₂	Fase I	87,0 \pm 17,6	75,1 \pm 15,0	0,003*
	Fase II	47,8 \pm 17,1	45,8 \pm 16,3	0,594
	Fase III	85,7 \pm 17,0	74,7 \pm 15,4	0,004*
	Δ II-I (%)	-45,4 \pm 12,6	-38,8 \pm 18,4	0,161
	Δ III-II (%)	-1,3 \pm 4,3	-0,5 \pm 4,1	0,535
	Vd (mmHg/min)	-24,3 \pm 5,8	-18,1 \pm 8,2	0,005*
	Vi (mmHg/min)	22,2 \pm 6,3	16,6 \pm 9,0	0,014*

3.1.2.2. Comparações de sexo

Ambos os sexos responderam com redução da perfusão entre as fases I e II. Já na fase de recuperação, as mulheres apresentaram diferenças face à fase I, enquanto que para os homens tal não se verificou. Tal sugere que nas mulheres o atingimento do valor basal de perfusão é mais lento. Quanto à tcpO_2 foram verificados decréscimos em ambos os sexos entre as fases I e II, não existindo, no entanto, diferenças entre as fases I e III, sugerindo que os valores de tcpO_2 estabilizam em tempos equivalentes em ambos os sexos. Os valores da velocidade de decremento foram consistentemente mais elevados que os da velocidade de incremento em ambos os sexos.

Estes resultados sugerem diferenças na resposta entre sexos. As mulheres apresentaram valores de PTEA significativamente mais baixos que os dos homens em todas as fases do protocolo (p fase I = 0,002, p fase II = 0,002, p fase III = 0,001). Estes resultados sugerem diferenças basais entre sexos, já descritas na bibliografia⁽¹⁹⁰⁾, e também uma diferente resposta em termos de dinâmica de água na pele entre sexos.

As mulheres apresentaram também valores de tcpO_2 significativamente mais elevados que os homens, o que se atribui à menor espessura da pele do sexo feminino, conforme descrito⁽²³¹⁾. Em virtude da sua menor espessura, a pele das mulheres poderá apresentar uma taxa metabólica menor e, por conseguinte, uma menor taxa de consumo de oxigénio como a pele dos homens. Já a velocidade de decremento e o valor durante a fase de oclusão não revelaram diferenças entre sexos. Não foram, contudo encontradas diferenças significativas entre o fluxo entre as fases de estabilização e recuperação. Já durante a oclusão, os homens registaram um valor de BZ mais elevado, sugerindo uma relação direta entre o valor basal de perfusão e o registado durante a oclusão. Encontraram-se diferenças também na resposta hiperémica, tendo as mulheres apresentado valores significativamente mais elevados de RF-PF e de TL e TR mais baixos. Estes resultados sugerem que, nestas condições experimentais, as mulheres responderam de forma mais rápida e intensa que os homens à remoção da oclusão no tornozelo.

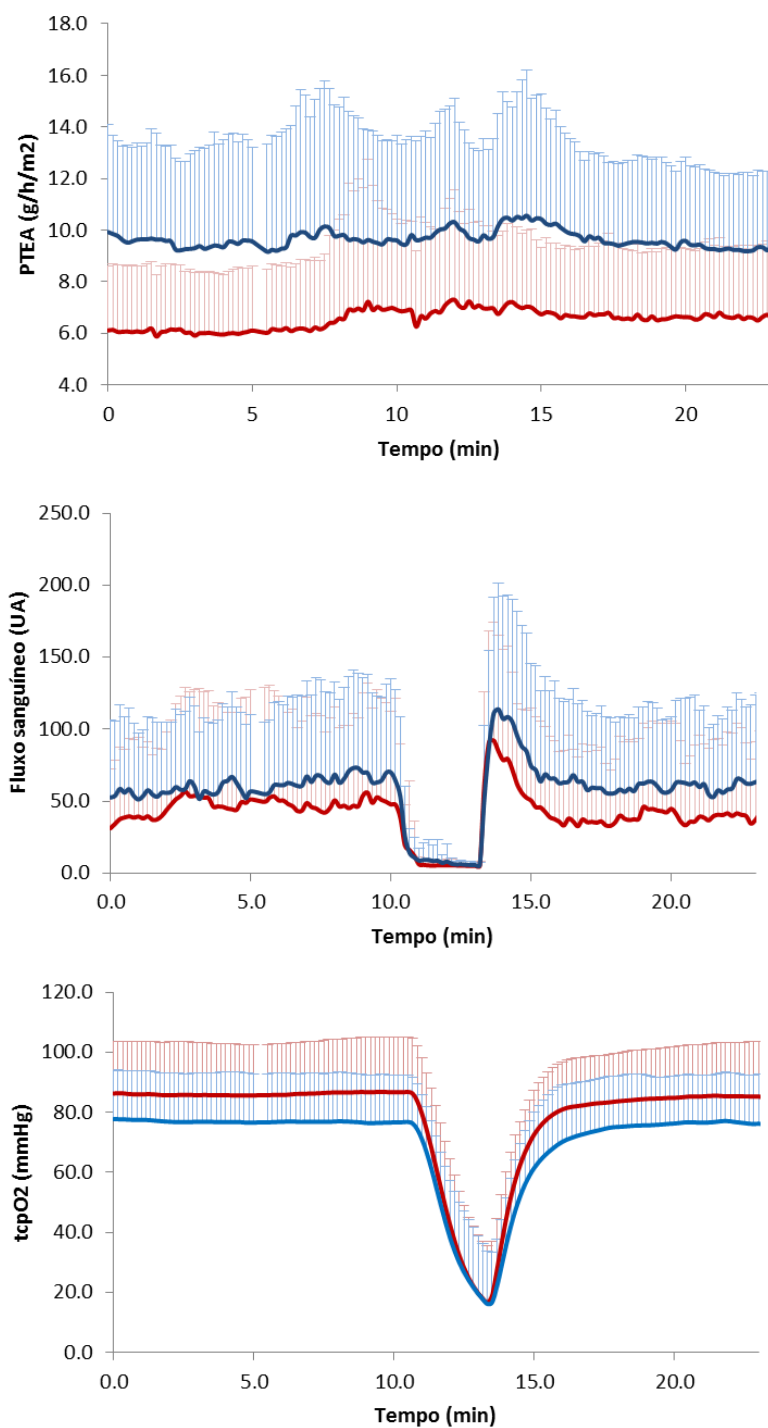


Figura 32. Evolução dos valores médios (+ desvio padrão) da PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição nos indivíduos de sexo feminino (traçado vermelho) e masculino (traçado azul) no protocolo de oclusão supra-sistólica. A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a oclusão dos 11 aos 13 minutos, e a recuperação entre os 14 e os 23 minutos.

Tabela 14. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de oclusão supra-sistólica (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para os indivíduos do sexo feminino e masculino. Comparação estatística entre sexos ($p < 0,05$, * - estatisticamente significativo).

		Feminino (N=33)	Masculino (N=32)	valor p
PTEA	Fase I	6,6 \pm 3,4	9,6 \pm 4,5	0,002*
	Fase II	7,0 \pm 3,3	10,4 \pm 4,9	0,002*
	Fase III	6,8 \pm 3,0	9,5 \pm 3,1	0,001*
	Δ II-I (%)	7,4 \pm 18,9	12,0 \pm 48,5	0,395
	Δ III-II (%)	7,2 \pm 27,3	1,9 \pm 20,5	0,729
LDF	Fase I	57,5 \pm 73,1	64,5 \pm 57,9	0,157
	Fase II	10,6 \pm 8,3	11,4 \pm 6,7	0,340
	Fase III	49,3 \pm 63,9	60,7 \pm 51,4	0,051
	Δ II-I (%)	-58,2 \pm 31,2	-68,5 \pm 24,5	0,129
	Δ III-II (%)	-1,5 \pm 44,3	17,2 \pm 88,6	0,568
	RF	56,1 \pm 67,0	60,9 \pm 52,8	0,165
	BZ	5,9 \pm 3,0	6,6 \pm 2,6	0,180
	PF	181,5 \pm 129,7	182,7 \pm 90,8	0,417
	RF-BZ	-73,7 \pm 22,2	-78,9 \pm 20,4	0,254
	BZ-PF	3178,8 \pm 1929,4	2832,5 \pm 1188,2	0,847
	RF-PF	497,6 \pm 343,2	375,2 \pm 310,7	0,149
	TL	2,0 \pm 1,1	2,5 \pm 1,8	0,172
	TR	3,8 \pm 3,6	5,4 \pm 4,8	0,067
	TH1	10,0 \pm 16,3	16,7 \pm 48,7	0,283
	TM	61,6 \pm 118,1	69,9 \pm 144,2	0,747
	TH2	75,5 \pm 116,9	83,9 \pm 144,3	0,752
	AO	7821,9 \pm 9726,4	8792,6 \pm 9052,6	0,357
	AH	5397,4 \pm 9207,9	6813,1 \pm 6864,9	0,043*
	AH/AO	3,8 \pm 14,3	1,1 \pm 1,3	0,541
	Fase I	86,4 \pm 17,6	76,8 \pm 16,0	0,045*
tcpO₂	Fase II	49,2 \pm 17,9	44,6 \pm 15,2	0,274
	Fase III	85,1 \pm 17,3	76,4 \pm 16,0	0,059
	Δ II-I (%)	-43,2 \pm 15,6	-41,5 \pm 16,0	0,663
	Δ III-II (%)	-1,4 \pm 4,6	-0,4 \pm 3,7	0,460
	Vd (mmHg/min)	-23,0 \pm 7,6	-19,9 \pm 7,4	0,051
	Vi (mmHg/min)	21,3 \pm 7,5	18,1 \pm 8,4	0,080

3.1.3. Respiração de oxigénio a 100%

Nos contextos experimental e clínico a respiração de oxigénio tem sido realizada em terapia normobárica (à pressão atmosférica)^(151, 158, 207) e terapia hiperbárica (acima da pressão atmosférica)⁽¹⁵⁶⁾. A terapia normobárica apresenta como vantagens a boa adesão por parte dos indivíduos, relação custo-benefício favorável, menores complicações e menores requerimentos técnicos⁽²³²⁾. Ambas as terapias provocam a saturação da hemoglobina, aumentando a quantidade de oxigénio dissolvida no plasma, criando hiperóxia. Em termos estritos “hiperóxia” é um termo inespecífico que se refere à elevação da tensão de oxigénio em qualquer compartimento tecidular, seja o alveolar ou qualquer compartimento extrapulmonar, enquanto que o termo “hiperoxémia” pode ser definido como uma tensão de oxigénio elevada no sangue. Apesar desta diferença ambos os termos são usados na prática intermutavelmente⁽²³³⁾. Neste texto será usado o termo “hiperóxia”. Tomando o intervalo definido por normoxémia como 10,7-13,3 kPa (80,3-99,8 mmHg), hiperoxémia é definida como $p_aO_2 > 13,3$ kPa (99,8 mmHg). No entanto, devido às diferenças na interpretação do termo “normal”, vários autores escolheram definir hiperoxémia como $p_aO_2 > 16$ kPa (120 mmHg)^(234, 235). A saturação de hemoglobina não é útil na definição de hiperoxémia, já que o oxigénio se pode dissolver no sangue e aumentar a PaO_2 mesmo após a ter atingido a saturação de 100% da hemoglobina⁽²³⁶⁾. Sabe-se que a hiperóxia provoca vasoconstrição em diversos órgãos, incluindo o encéfalo, a retina, o músculo esquelético, miocárdio e a própria pele⁽²³⁷⁾. No entanto, os mecanismos que estão na origem desta vasoconstrição não estão completamente esclarecidos.

Os indivíduos iniciaram a respiração de oxigénio a 100% a partir da botija no 11º minuto do registo. A respiração a partir da botija provocou o aumento significativo da $tcpO_2$ durante a fase de provocação em comparação com a de estabilização ($p < 0,001$), criando hiperóxia. A velocidade média de incremento foi de 36,7 mmHg/min, sendo atingido o valor máximo médio de 268,0 mmHg ao tempo médio de 19,4 min. Verificou-se uma diminuição significativa do fluxo sanguíneo na fase de provocação em comparação com a de estabilização ($p < 0,001$), provavelmente por vasoconstrição, e atribuída à hiperóxia. De facto, sabe-se que alterações de $tcpO_2$, sejam aumentos ou diminuições, evocam respostas vasculares⁽²³⁸⁾. A análise individual das respostas revelou que, dos 65 indivíduos estudados,

50 responderam com redução de perfusão / vasoconstrição, enquanto que 15 responderam com aumento de perfusão / vasodilatação. Utilizam-se ambos os termos uma vez que a tecnologia de LDF não permite avaliar a variação do calibre dos vasos, mas apenas o fluxo sanguíneo. Como tal, e em rigor, não se poderá garantir que a redução de fluxo se deva a uma vasoconstrição e o aumento a uma vasodilatação. No entanto, segundo resultados publicados por vários autores que utilizaram outras tecnologias, a hiperóxia provoca vasoconstrição, pelo que se considerou provável, no nosso caso, que a redução de fluxo se deva efetivamente a uma vasoconstrição e o aumento a uma vasodilatação.

Durante a provocação verificou-se ainda o aumento da PTEA, mas sem significância estatística. A respiração de oxigénio a 100% cessou ao 21º minuto. Em alguns indivíduos os valores de tcpO_2 continuaram a aumentar mesmo após a cessação da respiração a partir da botija, o que se deve à passagem para o sangue do oxigénio constante no espaço anatómico morto. A velocidade de decremento foi de 46,8 mmHg/min, um valor significativamente mais elevado que o de 36,7 mm Hg/min da velocidade de incremento ($p < 0,001$). Durante a fase de recuperação, os valores de tcpO_2 diminuíram e os de LDF aumentaram, mas sem atingir os valores de estabilização, tendo sido encontradas diferenças significativas entre os valores das duas fases ($p < 0,001$ e $p = 0,007$, respetivamente). Perante estes resultados considera-se que as condições iniciais de perfusão não foram atingidas, sendo provavelmente necessário um maior período de recuperação.

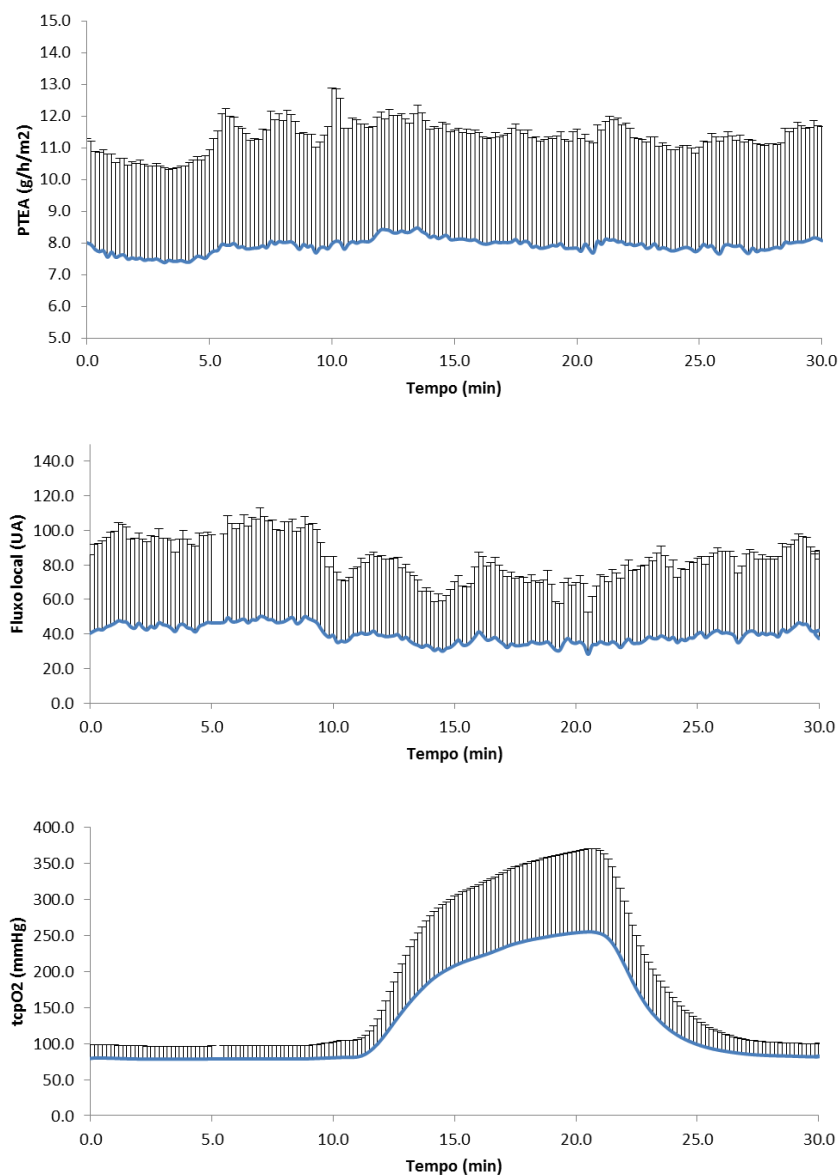


Figura 33. Evolução dos valores médios (+ desvio padrão) de PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição (N=65) no protocolo de respiração de oxigénio a 100%. A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a respiração de oxigénio dos 11 aos 20 minutos, e a recuperação entre os 21 e os 30 minutos.

Tabela 15. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de respiração de oxigénio a 100% (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para todos os indivíduos. Comparação estatística com a fase I ($p < 0,05$, * - estatisticamente significativo).

		Grupos 1 e 2	p
PTEA	Fase I	8,1 \pm 3,7	NA
	Fase II	8,2 \pm 3,4	0,062
	Fase III	8,1 \pm 3,3	0,200
	Δ II-I (%)	2,9 \pm 12,6	NA
	Δ III-II (%)	-0,5 \pm 12,4	NA
LDF	Fase I	45,7 \pm 51,6	NA
	Fase II	34,5 \pm 34,8	<0,001*
	Fase III	41,1 \pm 44,0	0,007*
	Δ II-I (%)	-15,2 \pm 42,9	NA
	Δ III-II (%)	48,8 \pm 132,4	NA
tcpO₂	Fase I	80,0 \pm 16,5	NA
	Fase II	241,2 \pm 105,2	<0,001*
	Fase III	86,0 \pm 17,8	<0,001*
	Δ II-I (%)	199,1 \pm 110,2	NA
	Δ III-II (%)	-59,2 \pm 15,2	NA
	Vi (mmHg/min)	36,7 \pm 27,3	<0,001*
	Vd (mmHg/min)	-46,8 \pm 32,0	
	tcpO ₂ máx (mmHg)	268,0 \pm 112,8	NA
	t-máx (min)	19,4 \pm 2,6	NA

Por forma a determinar eventuais relações entre parâmetros funcionais, testou-se a correlação entre vários parâmetros. O valor basal de tcpO₂ correlacionou-se negativamente com a velocidade de incremento de tcpO₂ ($p=0,041$), e positivamente com o valor máximo de tcpO₂ ($p=0,005$). Estas correlações sugerem o valor preditivo do tcpO₂ para a evolução do mesmo durante a fase de estabilização. Por outro lado, verificou-se uma correlação negativa entre velocidade de incremento e o valor máximo de tcpO₂ ($Rho=-0,918$, $p<0,001$). Estes resultados sugerem que um tecido com um maior valor basal de tcpO₂ conseguirá captar uma maior quantidade de oxigénio, mas a uma velocidade mais baixa em comparação com um tecido com um valor de tcpO₂ mais baixo. Dado que a sonda de tcpO₂ está aquecida e, portanto, a aumentar a perfusão local e a favorecer a quebra entre hemoglobina e oxigénio, o conteúdo deste gás no tecido depende quase exclusivamente da sua velocidade de

consumo. Dado que o aporte de oxigénio ao tecido foi constante (quer da sala, quer da botija), um elevado nível basal de tcpO₂ reduz a velocidade da difusão deste gás ao tecido.

Tabela 16. Coeficiente Rho da correlação de Spearman entre parâmetros do protocolo de respiração de oxigénio (p<0,05; * - estatisticamente significativo).

	Rho	p
tcpO ₂ fase I vs pico de tcpO ₂	0,348	0,005*
tcpO ₂ fase I vs Vi	-0,258	0,041*
Vi vs pico de tcpO ₂	-0,918	<0,001*

3.1.3.1. Comparação de grupos

Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos quanto aos valores basais de PTEA e fluxo sanguíneo. Já os valores basais de tcpO₂ foram significativamente mais baixos no grupo 2 (p=0,008), sugerindo uma diminuição da capacidade de oxigenação periférica com o aumento da idade. Os valores da velocidade de incremento dos dois grupos não apresentaram diferenças significativas (grupo 1 - 41,3 mmHg/min; grupo 2 - 31,0 mmHg/min). Já as velocidades de decremento foram significativamente diferentes (p=0,029). Os valores de tcpO₂ do grupo 1 diminuíram à média de 54,3 mmHg/min, enquanto que as do grupo 2 à média de 27,5 mmHg/min. Já os valores máximos de tcpO₂ foram-se significativamente diferentes nos dois grupos. O grupo 1 atingiu um pico médio de 297,7 mmHg, significativamente mais elevado que o pico médio de 230 mmHg do grupo 2 (p=0,025). O facto de não existirem diferenças na velocidade de incremento pode ser explicado pelo facto de este ser um parâmetro essencialmente dependente da velocidade de inalação de oxigénio, assumindo não existir diferenças na capacidade de transporte de oxigénio entre ambos os grupos. O aparato que permite a inalação inclui a própria máscara e o tubo que conecta a máscara ao redutor de pressão da botija. O volume deste aparato leva ao aumento do espaço anatómico morto e, como tal, ao aumento da resistência inspiratória⁽²³⁹⁾. Isto provoca a diminuição dos níveis de tcpO₂, o que conduz à ativação dos quimiorrecetores e a um aumento da frequência e profundidade ventilatória⁽²³⁹⁾. Por outro lado, pelo facto de a hemoglobina estar saturada com oxigénio, terá menos capacidade de se ligar ao dióxido de carbono – o chamado efeito de

Haldane⁽²⁴⁰⁾. Este gás passa a ser transportado preferencialmente na forma de bicarbonato e dissolvido como CO₂ no plasma. O aumento consequente da pCO₂ no sangue venoso e, posteriormente, no encéfalo, estimula também a ventilação⁽²⁴¹⁾. Existindo este aumento de ventilação nos dois grupos, é lógico que não se verifiquem diferenças na velocidade de incremento. Já a velocidade de decremento não depende da ventilação, uma vez que esta retomou o padrão da fase de estabilização. Como tal, pode-se atribuir a menor velocidade de decremento do grupo 2 à redução da taxa de consumo de oxigénio, ou seja, da taxa metabólica cutânea. Para além de uma possível redução na taxa metabólica pode assumir-se também que a própria capacidade de captação de oxigénio é menor em indivíduos mais velhos uma vez que o pico de tcpO₂ foi significativamente inferior no grupo 2.

Tabela 17. Estatística descritiva (média ± desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de respiração de oxigénio a 100% (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para os indivíduos dos grupos 1 e 2. Comparação estatística entre grupos (p<0,05, * - estatisticamente significativo).

		Grupo 1 (N=35)	Grupo 2 (N=30)	Valor p
PTEA	Fase I	7,2 ± 2,7	9,4 ± 4,5	0,616
	Fase II	7,4 ± 2,9	9,3 ± 3,7	0,085
	Fase III	7,3 ± 2,8	9,2 ± 3,6	0,641
	ΔII-I (%)	2,7 ± 12,7	3,2 ± 12,8	0,980
	ΔIII-II (%)	-0,5 ± 7,8	-0,4 ± 17,8	0,786
LDF	Fase I	40,7 ± 45,3	52,0 ± 58,8	0,287
	Fase II	28,0 ± 27,6	42,7 ± 41,3	0,089
	Fase III	39,6 ± 48,3	43,0 ± 38,7	0,251
	ΔII-I (%)	-14,1 ± 50,8	-17,1 ± 26,2	0,634
	ΔIII-II (%)	41,3 ± 80,0	61,2 ± 192,2	0,576
tcpO₂	Fase I	84,4 ± 15,3	74,6 ± 16,6	0,008*
	Fase II	269,7 ± 108,6	205,5 ± 90,5	0,034*
	Fase III	89,6 ± 17,2	81,4 ± 17,7	0,066
	ΔII-I (%)	213,0 ± 118,7	176,0 ± 92,8	0,218
	ΔIII-II (%)	-61,4 ± 15,1	-55,6 ± 15,0	0,143
	Vi (mmHg/min)	41,3 ± 28,9	31,0 ± 24,4	0,180
	Vd (mmHg/min)	-54,3 ± 31,8	-37,5 ± 30,2	0,029*
	tcpO ₂ (mmHg)	297,7 ± 114,2	230,8 ± 101,0	0,025*
	t-máx (min)	19,8 ± 2,2	18,9 ± 2,9	0,289

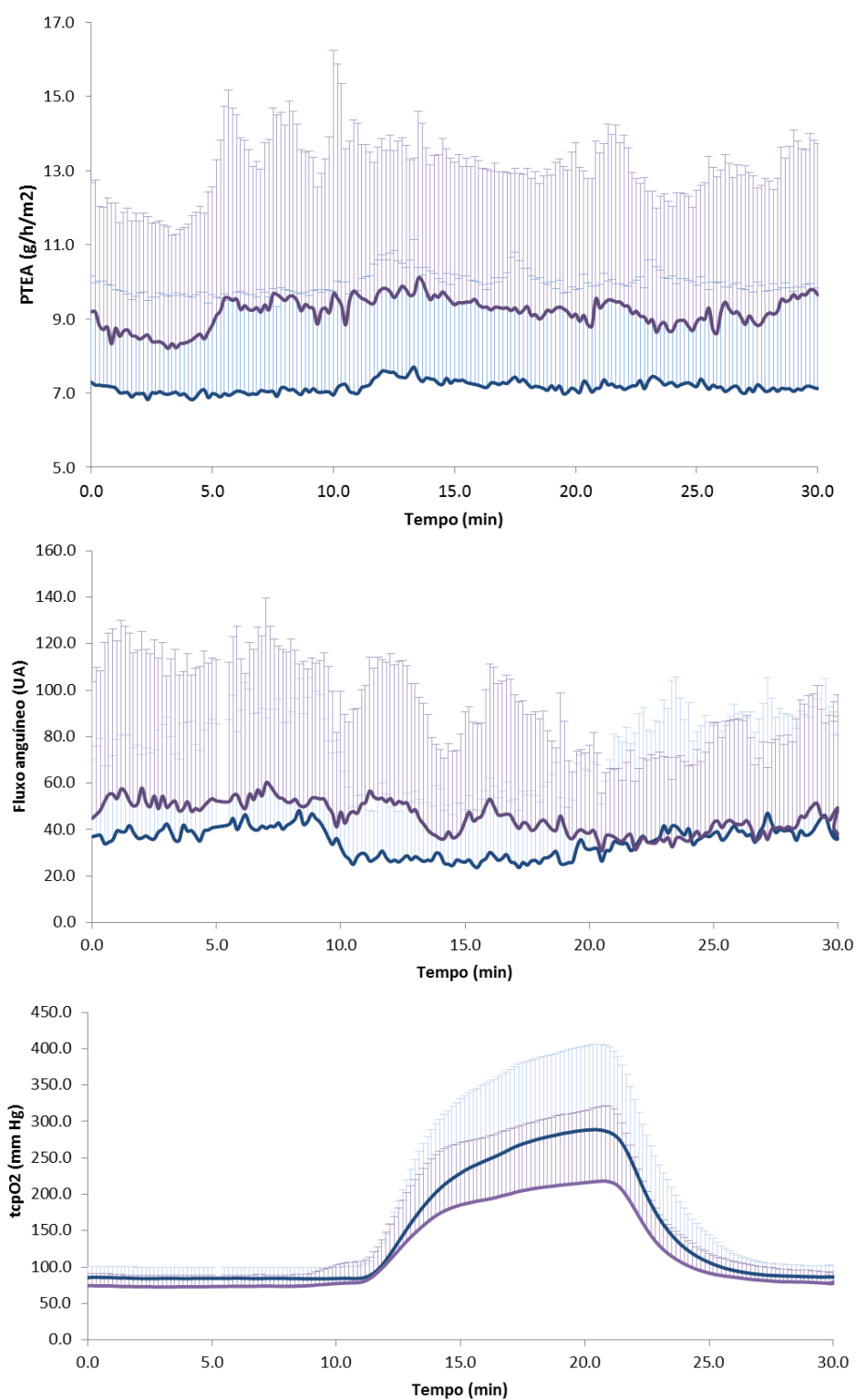


Figura 34. Evolução dos valores médios (+ desvio padrão) de PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição para os grupos 1 (traçado azul) e 2 (traçado roxo) no protocolo de respiração de oxigénio a 100%. A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a respiração de oxigénio dos 11 aos 20 minutos, e a recuperação entre os 21 e os 30 minutos.

3.1.3.2. Comparações de sexo

Foram encontrados valores de fluxo sanguíneo significativamente maiores nos homens que nas mulheres nas fases de estabilização de recuperação ($p=0,014$), como foi já reportado anteriormente⁽²⁴²⁾. Tal diferença tem sido atribuída a um maior tónus vascular de origem simpática nas mulheres⁽²⁴³⁾. Esta explicação faz sentido assumindo que o reflexo venoarteriolar se encontra em atuação nesta posição anatómica. Na posição de sentado, o sangue acumula-se no membro inferior pelo efeito da gravidade, elevando a pressão venosa⁽²⁴⁴⁾. Este aumento, por sua vez, induz o reflexo venoarteriolar, que causa vasoconstrição arteriolar e, conseqüentemente, redução de perfusão. O sistema nervoso simpático está envolvido na modulação deste reflexo⁽²⁴⁵⁾, portanto, o valor de perfusão diminuído nas mulheres pode dever-se efetivamente a um maior tónus vascular simpático, mas também ao efeito do reflexo venoarteriolar. Assumindo esta “vasoconstrição venoarteriolar” mais pronunciada no sexo feminino, o facto de não se encontrarem diferenças significativas nos valores basais de $tcpO_2$ parece contraditório. No entanto, sabe-se que este reflexo é eliminado pelo efeito da temperatura. O facto de a sonda de $tcpO_2$ se encontrar a $44^{\circ}C$ pode ter provocado “simpatólise térmica”, impedindo a atuação do sistema vasoconstritor⁽²⁴³⁾. Pelo contrário, esta temperatura causa vasodilatação, o que maximiza o aporte de oxigénio à sonda. O facto de não existirem diferenças entre sexos para estes valores de $tcpO_2$ pode ser explicado pelo facto da vasodilatação induzida pelo aquecimento ter sido equivalente entre sexos, o que terá causado um aporte equivalente de oxigénio à zona de medição. Os homens apresentaram valores de velocidade de incremento e decremento de $tcpO_2$ superiores aos das mulheres, bem como valores máximos de $tcpO_2$ maiores e atingidos mais tarde. No entanto, nenhuma destas diferenças foi estatisticamente significativa. Os homens apresentaram valores de PTEA significativamente mais elevados que os das mulheres em todas as fases, diferenças estas que já discutidas atrás.

Tabela 18. Estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) para os últimos 5 minutos de cada fase do protocolo de respiração de oxigênio a 100% (fase I – estabilização, fase II – elevação, fase III – recuperação) para os indivíduos do sexo feminino e masculino. Comparação estatística entre sexos ($p < 0,05$, * - estatisticamente significativo).

		Feminino (N=33)	Masculino (N=32)	p
PTEA	Fase I	6,2 \pm 2,3	10,0 \pm 3,9	<0,001*
	Fase II	6,6 \pm 2,8	9,7 \pm 3,2	<0,001*
	Fase III	6,5 \pm 2,4	9,8 \pm 3,3	<0,001*
	Δ II-I (%)	2,4 \pm 10,5	3,5 \pm 14,7	0,317
	Δ III-II (%)	1,0 \pm 13,3	-2,0 \pm 11,4	0,665
LDF	Fase I	34,0 \pm 47,3	57,1 \pm 53,7	0,014*
	Fase II	29,7 \pm 36,9	39,1 \pm 32,6	0,059
	Fase III	29,3 \pm 39,1	52,6 \pm 46,0	0,011*
	Δ II-I (%)	-12,4 \pm 53,3	-18,2 \pm 29,3	0,402
	Δ III-II (%)	30,6 \pm 75,1	67,7 \pm 172,8	0,324
tcpO₂	Fase I	84,1 \pm 15,5	76,1 \pm 16,8	0,092
	Fase II	225,6 \pm 97,1	256,4 \pm 111,9	0,196
	Fase III	87,2 \pm 16,5	84,8 \pm 19,2	0,505
	Δ II-I (%)	171,6 \pm 109,9	227,6 \pm 105,0	0,019*
	Δ III-II (%)	-56,4 \pm 16,0	-62,1 \pm 14,0	0,032*
	Vi (mmHg/min)	33,0 \pm 25,3	40,3 \pm 29,0	0,398
	Vd (mmHg/min)	-43,5 \pm 29,6	-50,0 \pm 34,3	0,466
	tcpO ₂ máx (mm Hg)	250,3 \pm 108,7	285,1 \pm 115,7	0,248
	t-máx (min)	19,2 \pm 3,0	19,6 \pm 2,1	0,788

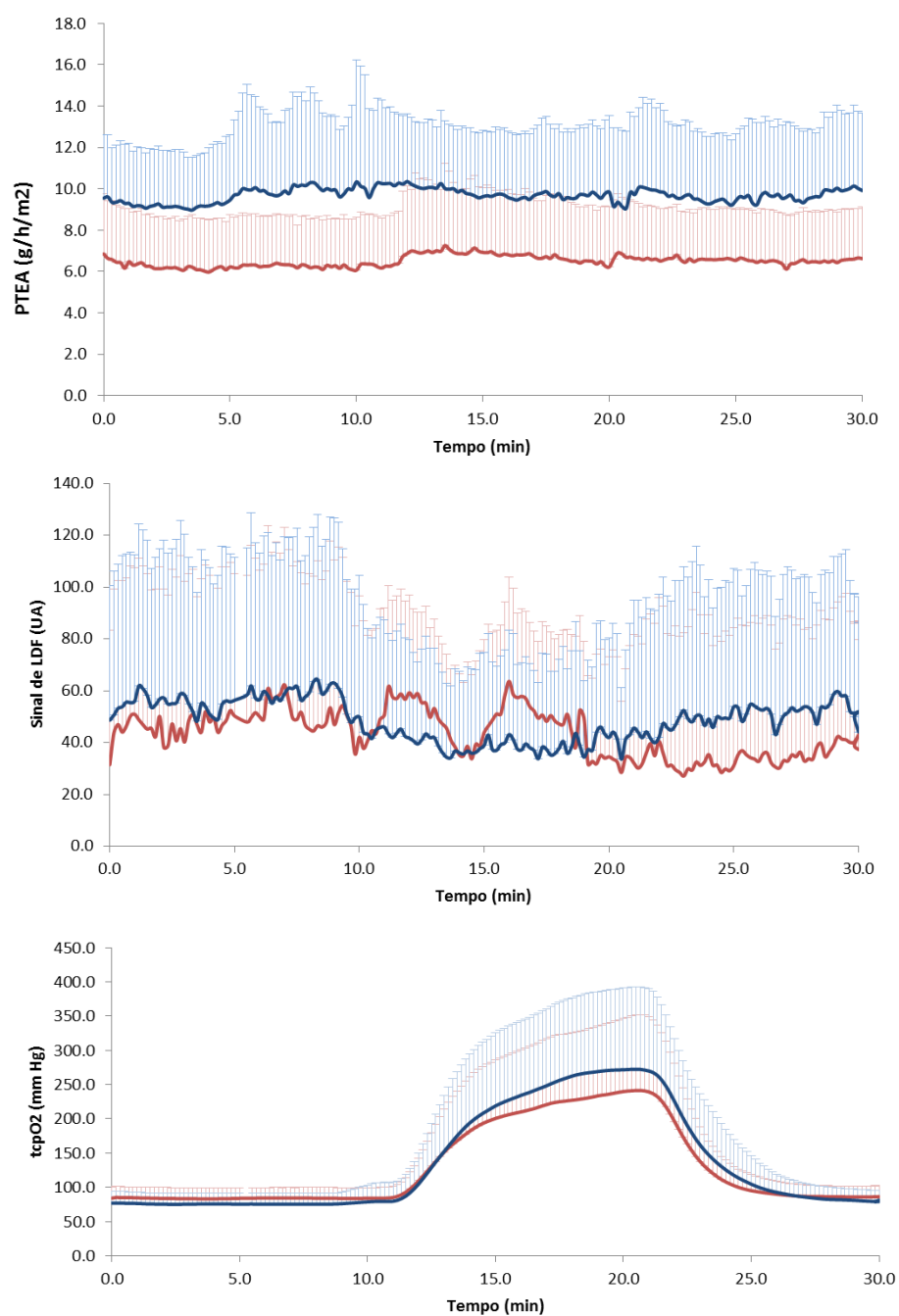


Figura 35. Evolução dos valores médios (+ desvio padrão) de PTEA (em cima), fluxo sanguíneo (ao centro) e tcpO₂ (em baixo) ao longo dos 30 minutos de medição para o sexo feminino (traçado vermelho) e masculino (traçado azul) no protocolo de respiração de oxigénio a 100%. A estabilização dá-se dos 0 aos 10 minutos, a respiração de oxigénio dos 11 aos 20 minutos, e a recuperação entre os 21 e os 30 minutos.

3.1.4. Relações de perfusão - barreira epidérmica

Por forma a determinar se as alterações de perfusão estavam relacionadas com as alterações da PTEA observadas, fez-se um teste de correlação de Spearman (duas caudas, $p < 0,05$). Testou-se a correlação entre a variação percentual de fluxo e a variação percentual de PTEA entre as fases de estabilização e provocação, e entre as fases de recuperação e provocação de cada um dos três protocolos experimentais.

Tabela 19. Coeficiente Rho da correlação de Spearman entre as variações percentuais do fluxo sanguíneo e da PTE para os três protocolos experimentais ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

	Elevação passiva da perna		Oclusão supra-sistólica		Respiração de oxigénio	
	Rho	valor p	Rho	valor p	Rho	valor p
Var LDF I-II (%) vs Var PTEA I-II (%)	-0,031	0,811	0,112	0,379	-0,264	0,051
Var LDF II-III (%) vs Var PTEA II-III (%)	-0,063	0,626	0,023	0,862	0,100	0,471

No protocolo de elevação passiva da perna foi encontrada uma relação inversa nas variações entre as fases I e II e entre as fases I e III, apesar de não apresentarem significância estatística. No protocolo de oclusão supra-sistólica verificaram-se relações diretas nas variações entre as fases I e II e entre as fases II e III, mas igualmente sem significância estatística. No protocolo de respiração de oxigénio verificou-se uma relação inversa nas variações entre as fases I e II. Já entre as fases II e III verificou-se uma relação positiva, mas sem significância. Estes resultados sugerem a existência de correlações diretas e inversas entre variações de perfusão e de PTEA. Apesar da ausência de alterações estatisticamente significativas, a alteração das condições de perfusão local pode induzir alterações na dinâmica da água epidérmica por modificações nas forças de Starling locais. Estes diferentes perfis de correlação podem dever-se às diferenças posturais, mas também às diferenças na magnitude de alteração da perfusão. A relação entre perfusão local e função de barreira cutânea parece ser complexa, merecendo estudos posteriores e de maior robustez.

3.2. Segundo objetivo: encontrar as melhores ferramentas de análise fina do sinal de LDF

A presente secção apresenta os resultados da aplicação das ferramentas de análise do sinal de LDF recolhido durante as três manobras dinâmicas aplicadas ao modelo humano. Uma vez que o presente estudo se foca na contribuição das ferramentas de análise para a compreensão dos componentes do sinal de LDF, os resultados estão agrupados por cada ferramenta de análise aplicada.

3.2.1. *Transformada de ondeleta (WT)*

3.2.1.1. Elevação passiva da perna

Numa primeira análise, a WT revelou que as contribuições relativas das várias componentes aumentaram progressivamente da componente de mais alta frequência, para a componente de mais baixa frequência. Tal observação permite concluir que o sinal de LDF é predominantemente de origem endotelial. Observou-se um aumento significativo da atividade cardíaca ($p=0,039$), um aumento não significativo da atividade endotelial independente de NO, uma diminuição significativa das atividades respiratória e miogénica ($p<0,001$ e $p=0,035$, respetivamente) e uma diminuição não significativa das atividades simpática e endotelial dependente de NO. A elevação passiva da perna provoca, como mencionado acima, uma transferência gravitacional de sangue para o compartimento circulatório central, aumentando sequencialmente a pré-carga e o volume de ejeção dos ventrículos direito e esquerdo de acordo com a lei de Frank-Starling^(246, 247). O aumento da atividade cardíaca do sinal de LDF na fase de provocação pode refletir, portanto, a resposta cardíaca a esta provocação hemodinâmica. A diminuição da atividade respiratória pode ser explicada pela alteração postural propriamente dita. É lógico que a elevação da perna a 45° promova uma redução da pressão intra-abdominal⁽²⁴⁸⁾ e aumente o peso exercido pelos órgãos abdominais sobre o diafragma, diminuindo a amplitude dos movimentos respiratórios. A diminuição da atividade miogénica durante a elevação sugere uma

diminuição na intensidade deste mecanismo. Aparentemente este resultado está em oposição ao que é conhecido acerca deste mecanismo, uma vez que aquando de uma redução de perfusão seria esperado encontrar-se uma vasodilatação de natureza miogénica, neste caso, um aumento do rácio desta amplitude^(31, 249). A observação de uma redução desta atividade sugere o envolvimento de outros mecanismos. A diminuição da atividade simpática, ainda que sem significância estatística, faz igualmente sentido a nível fisiológico. O aumento da pressão circulatoria central iniciada pela alteração postural estimula os barorreceptores de alta e baixa pressão que, em resposta, diminuem as eferências simpáticas aos vasos sanguíneos⁽²⁵⁰⁾. As alterações ao nível endotelial ocorreram em dois sentidos – a atividade dependente de NO sofreu uma diminuição, enquanto que a independente de NO sofreu um aumento. Estes resultados sugerem que durante o período em que o membro inferior recebe menor perfusão, a produção endotelial de vasodiladores que não o NO, provavelmente prostaglandinas, aumenta, com o intuito de provocar vasodilatação e, assim, tentar manter uma perfusão adequada. Esta hipótese faz sentido se se considerar que um estímulo para a produção de NO é o aumento da tensão de cisalhamento endotelial⁽²⁵¹⁾. Durante a elevação da perna, a pressão de perfusão é menor e, consequentemente, também o será a tensão de cisalhamento, o que provocará a diminuição da síntese de NO. Esta resposta endotelial dual sugere que o endotélio apresenta um mecanismo autócrino de regulação, mais concretamente, que o NO iniba a produção de outros vasodiladores, inibição esta que desaparece durante a elevação da perna.

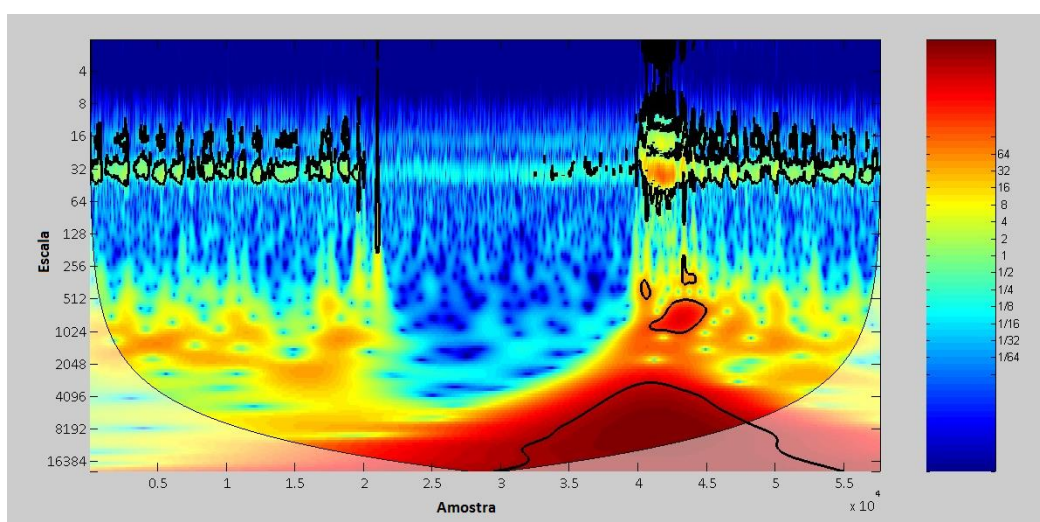


Figura 36. Escalograma do sinal de LDF de um indivíduo representativo (#27, masculino, 23 anos) ao longo dos 30 minutos (1800 segundos, correspondendo a 57600 amostras) do protocolo de elevação passiva da perna.

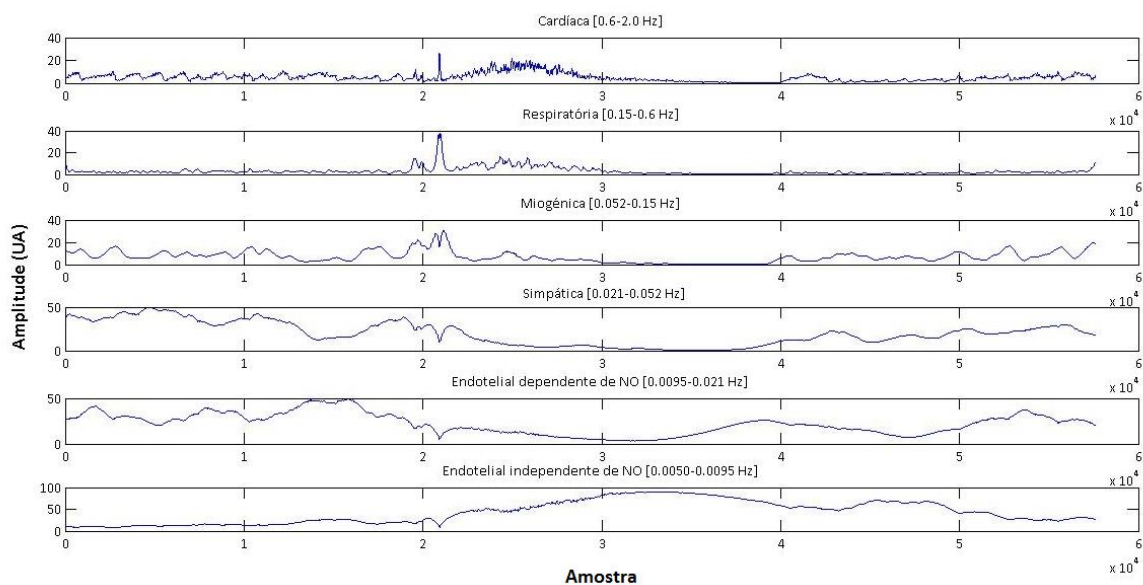


Figura 37. Evolução da amplitude (expressa em unidades arbitrárias) de cada componente do sinal de LDF de um indivíduo representativo (#27, masculino, 23 anos) ao longo dos 30 minutos (1800 segundos, correspondendo a 57600 amostras) do protocolo de elevação passiva da perna.

Tabela 20. Média e desvio-padrão (dp) do rácio de amplitude das diferentes componentes do sinal de LDF (N=65). Comparação com a fase de estabilização ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Cardíaca	média	4,0	4,5	3,4
	dp	1,8	2,3	1,3
	p	-	0,039*	0,600
Respiratória	média	3,3	3,0	3,0
	dp	1,5	1,7	1,4
	p	-	<0,001*	0,603
Miogénica	média	11,9	7,4	12,2
	dp	4,2	5,4	5,1
	p	-	0,035*	0,538
Simpática	média	20,6	12,8	18,3
	dp	5,2	7,5	5,3
	p	-	0,654	0,262
Endotelial dependente de NO	média	28,5	22,2	25,8
	dp	6,5	6,3	5,1
	p	-	0,286	0,218
Endotelial independente de NO	média	31,7	50,1	37,4
	dp	7,5	17,1	9,5
	p	-	0,334	0,193

3.2.1.1.1. Comparação de grupos

O grupo de indivíduos mais velhos apresentou valores de atividade miogénica significativamente mais elevados na fase de estabilização face ao grupo de indivíduos mais jovens ($p=0,014$). Esta diferença parece explicar o maior valor de fluxo encontrado nos indivíduos mais velhos. Apesar da hipótese apresentada atrás de uma redução do tónus simpático com o avanço da idade, estes resultados sugerem que em supinação a contribuição simpática para o fluxo sanguíneo foi equivalente nos dois grupos de indivíduos. Não foram encontradas também diferenças significativas nas componentes endoteliais durante esta fase. Durante a provocação, os indivíduos mais velhos apresentaram valores de atividade miogénica ($p<0,001$) mais elevados, bem como de atividade simpática ($p=0,001$). Estes resultados sugerem que durante a elevação estas atividades são afetadas em menor extensão em indivíduos mais velhos. A atividade endotelial dependente de NO foi maior nos indivíduos mais velhos, mas sem significância estatística, sugerindo a presença de um estímulo indutor da produção de NO mais forte neste grupo. Efetivamente, durante a provocação, o maior fluxo sanguíneo registado para os indivíduos mais velhos pode ter provocado uma maior tensão de cisalhamento e, por conseguinte, uma maior produção endotelial de NO. Em oposição, a atividade independente de NO foi maior nos indivíduos mais jovens durante a provocação. Assumindo novamente uma capacidade de regulação autócrina da atividade endotelial, estes resultados sugerem que indivíduos mais velhos apresentam uma resposta vasodilatadora local compensatória diminuída face a indivíduos mais jovens.

Tabela 21. Média e desvio-padrão (dp) da amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de elevação da perna entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Amplitude		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Cardíaca	média	4,1	3,8	3,9	5,2	3,4	3,3
	dp	1,8	1,9	1,8	2,7	1,2	1,4
	p	0,296		0,067		0,594	
Respiratória	média	3,5	3,1	3,2	2,9	3,1	2,9
	dp	1,7	1,3	2,0	1,2	1,4	1,4
	p	0,298		0,909		0,414	
Miogénica	média	11,1	12,9	5,1	10,2	11,5	13,0
	dp	4,8	3,2	3,3	6,2	5,4	4,5
	p	0,014*		<0,001*		0,090	
Simpática	média	20,5	20,8	10,0	16,1	18,8	17,6
	dp	4,7	5,8	6,7	7,1	3,9	6,6
	p	0,995		0,001*		0,275	
Endotelial dependente de NO	média	28,9	28,0	20,6	24,2	25,5	26,2
	dp	6,2	7,0	5,5	6,8	4,7	5,6
	p	0,553		0,050		0,756	
Endotelial independente de NO	média	31,9	31,5	57,4	41,4	37,9	36,9
	dp	6,9	8,2	15,8	14,6	8,6	10,5
	p	0,656		<0,001*		0,517	

3.2.1.1.2. Comparação de sexos

Na fase de estabilização, a atividade cardíaca apresentou-se significativamente mais elevada nas mulheres ($p=0,040$). A atividade respiratória também se apresentou mais elevada neste sexo, mas sem significância estatística. Estas diferenças podem ser entendidas como manifestações de stresse. As atividades endoteliais apresentaram valores ligeiramente mais elevados nas mulheres, mas sem significância estatística. Já as atividades miogénica e simpática apresentaram-se ligeiramente mais elevadas nos homens, mas também sem significância. Tendo em conta a contribuição destes mecanismos para a regulação da perfusão local, o facto de o fluxo sanguíneo se encontrar mais elevado nos homens parece, à partida, ser atribuído à atividade miogénica. Na fase de provocação a atividade respiratória continuou mais elevada nas mulheres face aos homens, diferença essa que agora se tornou estatisticamente significativa ($p=0,026$). As restantes atividades não

apresentaram diferenças significativas entre sexos durante a provocação. Estes dados sugerem que ambos os sexos apresentam atividades semelhantes durante a estabilização e que respondem de forma semelhante à elevação passiva da perna.

Tabela 22. Média e desvio-padrão (dp) da amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de elevação da perna entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os sexos feminino e masculino para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Amplitude		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino
Cardíaca	média	4,4	3,6	4,6	4,4	3,6	3,1
	dp	1,9	1,7	2,5	2,1	1,4	1,2
	p	0,040*		0,783		0,202	
Respiratória	média	3,6	3,0	3,6	2,5	3,4	2,7
	dp	1,7	1,1	2,0	1,1	1,7	0,8
	p	0,172		0,026*		0,204	
Miogénica	média	11,1	12,7	7,8	7,0	11,3	13,0
	dp	3,7	4,6	6,4	4,2	4,3	5,7
	p	0,165		0,941		0,224	
Simpática	média	19,6	21,6	11,2	14,4	17,9	18,6
	dp	4,4	5,8	7,0	7,8	4,7	5,8
	p	0,122		0,091		0,596	
Endotelial dependente de NO	média	28,9	28,0	21,5	23,0	26,6	25,0
	dp	6,7	6,4	7,1	5,4	4,5	5,6
	p	0,524		0,173		0,222	
Endotelial independente de NO	média	32,3	31,2	51,5	48,8	37,3	37,6
	dp	7,0	8,0	17,9	16,5	9,0	10,1
	p	0,448		0,528		0,946	

3.2.1.2. Oclusão supra-sistólica

Observou-se novamente que as contribuições relativas das várias componentes aumentaram progressivamente da componente de mais alta frequência, para a componente de mais baixa frequência. Durante o período de oclusão, a amplitude do sinal de LDF diminuiu significativamente, o que explica a redução significativa do rácio das amplitudes das componentes cardíaca ($p < 0,001$), respiratória ($p < 0,001$), miogénica ($p < 0,001$) e simpática ($p < 0,001$). Verificou-se, no entanto, o aumento significativo do rácio das

componentes endotelial dependente de NO ($p<0,001$) e independente de NO ($p<0,001$). Esta disparidade da resposta das componentes endoteliais face às restantes pode ser explicada de duas maneiras:

- o aumento da contribuição destas componentes pode ser real e espelhar o processo fisiológico em curso, isto é, o aumento da produção de NO e outros mediadores endoteliais, presumivelmente vasodilatadores, que colaborem para a criação da resposta hiperémica;

- o aumento da contribuição destas componentes pode ser aparente e resultar de picos no sinal de LDF que tenham ocorrido imediatamente antes do início da oclusão, mas que, devido à resolução finita da WT, surgem progressivamente mais largos à medida que se exploram as componentes de frequência mais baixa.

Durante a fase de recuperação verificou-se o aumento significativo do rácio das componentes respiratória ($p=0,008$), miogénica ($p=0,014$) mas a diminuição do rácio da componente endotelial independente de NO ($p=0,0013$). O aumento da contribuição respiratória pode dever-se a uma variação na ventilação entre as duas fases e não parece estar envolvida na resposta vascular em curso. Já o aumento da contribuição miogénica parece estar ligado à resposta hiperémica, uma vez que a fase pós-pico da hiperémia reativa é precisamente explicada pelo relaxamento vascular de origem miogénica⁽²⁰⁵⁾. A diminuição da contribuição endotelial independente de NO pode dever-se à cessação da atividade endotelial.

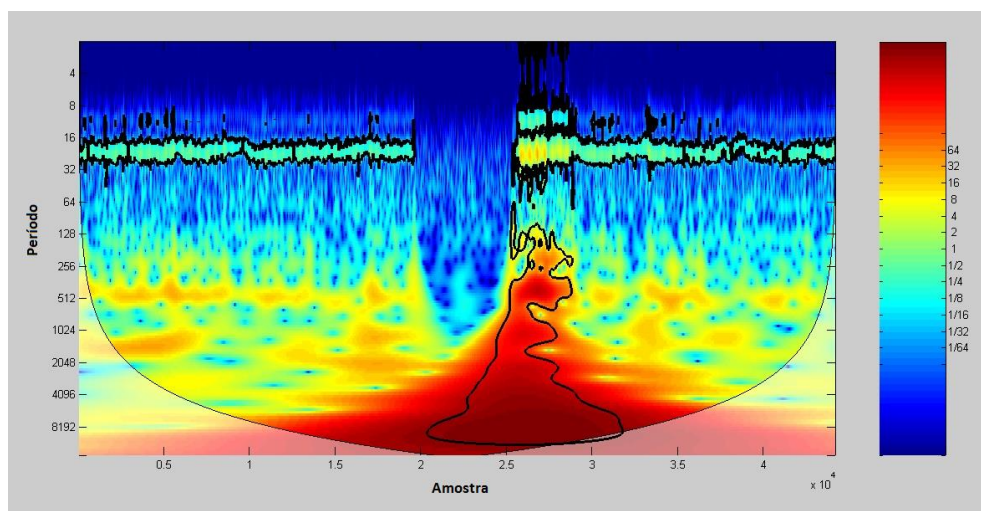


Figura 38. Escalograma do sinal de LDF de um indivíduo representativo (#27, masculino, 23 anos) durante os 23 minutos (1380 segundos, correspondendo a 44160 amostras) do protocolo de oclusão supra-sistólica.

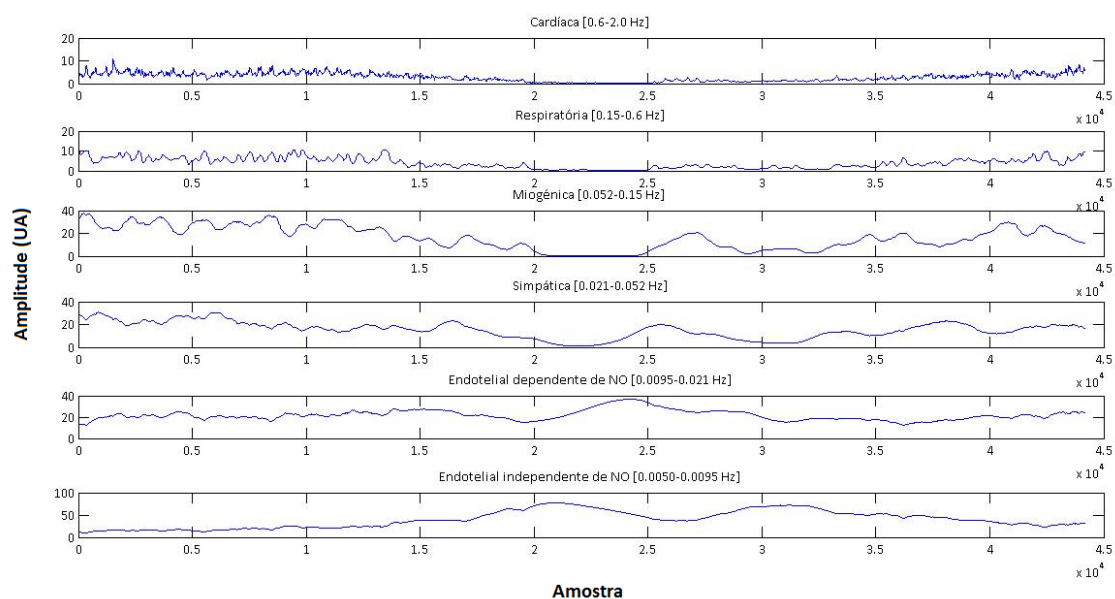


Figura 39. Evolução da amplitude (expressa em unidades arbitrárias) de cada componente do sinal de LDF de um indivíduo representativo (#27, masculino, 23 anos) ao longo dos 30 minutos (1380 segundos, correspondendo a 44160 amostras) do protocolo de oclusão supra-sistólica.

Tabela 23. Média e desvio-padrão (dp) do rácio de amplitude das diferentes componentes do sinal de LDF (N=65). Comparação com a fase de estabilização (p<0,05; * - estatisticamente significativa).

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Cardíaca	média	2,60	0,45	2,69
	dp	1,58	0,29	1,51
	p	-	<0,001*	0,254
Respiratória	média	4,11	1,21	4,70
	dp	3,24	0,93	4,09
	p	-	<0,001*	0,008*
Miogénica	média	11,47	3,52	12,48
	dp	4,67	1,93	4,64
	p	-	<0,001*	0,014*
Simpática	média	18,69	10,19	19,20
	dp	4,99	3,61	4,53
	p	-	<0,001*	0,317
Endotelial dependente de NO	média	27,56	30,41	28,57
	dp	5,57	6,36	5,96
	p	-	<0,001*	0,227
Endotelial independente de NO	média	35,60	54,29	32,42
	dp	8,86	9,46	8,89
	p	-	<0,001*	0,013*

3.2.1.2.1. Comparação de grupos

Na fase de estabilização não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos. O grupo 2 apresentou atividades miogénica, simpática e endoteliais menores que o grupo 1 nesta fase, o que corrobora achados anteriores⁽²⁵²⁾. No entanto, apesar de presentes, estas diferenças são muito pouco expressivas em termos estatísticos, como se observa pelos seus elevados valores de p. A oclusão provocou um efeito semelhante e indistinguível do ponto de vista estatístico nas atividades de todas as componentes do sinal de LDF. As atividades de ambos foram semelhantes também na fase de recuperação, sugerindo que a recuperação das condições iniciais de perfusão dos dois grupos foi semelhante.

Tabela 24. Média e desvio-padrão (dp) do rácio da amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de oclusão supra-sistólica entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Rácio de amplitude		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Cardíaca	média	2,4	2,8	0,5	0,4	2,6	2,8
	dp	1,4	1,8	0,3	0,3	1,4	1,7
	p	0,388		0,593		0,585	
Respiratória	média	3,8	4,6	1,2	1,2	4,1	5,4
	dp	2,8	3,7	0,8	1,1	2,8	5,2
	p	0,909		0,651		0,642	
Miogénica	média	11,5	11,4	3,5	3,6	12,7	12,3
	dp	5,0	4,3	1,8	2,1	4,8	4,5
	p	0,803		0,930		0,716	
Simpática	média	18,7	18,6	9,6	10,9	18,6	19,9
	dp	5,4	4,6	3,0	4,2	4,9	4,0
	p	0,798		0,235		0,157	
Endotelial dependente de NO	média	27,7	27,4	30,0	30,9	27,8	29,5
	dp	5,4	5,9	6,5	6,2	5,6	6,3
	p	0,957		0,356		0,328	
Endotelial independente de NO	média	35,9	35,2	55,4	53,0	34,3	30,1
	dp	9,5	8,1	8,5	10,5	9,2	8,1
	p	0,741		0,332		0,062	

3.2.1.2.2. Comparação de sexos

As atividades miogénica e endoteliais foram mais elevadas no sexo masculino, enquanto que as atividades cardíaca, respiratória, e simpática foram menos elevadas, não se tendo observado significância estatística para nenhuma destas diferenças. Durante as fases de provocação e recuperação não foram notadas diferenças significativas em nenhuma atividade entre sexos, sugerindo que a resposta microcirculatória à oclusão e à recuperação da mesma é idêntica entre sexos.

Tabela 25. Média e desvio-padrão (dp) do rácio de amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de oclusão supra-sistólica entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os sexos feminino e masculino para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Rácio de amplitude		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino
Cardíaca	média	2,7	2,5	0,5	0,4	2,7	2,6
	dp	1,4	1,7	0,4	0,2	1,3	1,7
	p	0,330		0,083		0,280	
Respiratória	média	4,2	4,0	1,4	1,1	5,0	4,4
	dp	3,2	3,3	1,2	0,6	4,8	3,3
	p	0,707		0,397		0,658	
Miogénica	média	11,4	11,5	3,5	3,6	12,2	12,8
	dp	4,7	4,7	1,7	2,1	4,6	4,7
	p	0,952		0,979		0,605	
Simpática	média	19,6	17,8	10,6	9,8	18,6	19,8
	dp	5,2	4,6	4,0	3,1	4,5	4,6
	p	0,119		0,624		0,375	
Endotelial dependente de NO	média	27,1	28,1	29,7	31,1	29,4	27,7
	dp	4,9	6,2	6,0	6,7	6,1	5,7
	p	0,768		0,368		0,262	
Endotelial independente de NO	média	35,0	36,2	54,4	54,2	32,0	32,8
	dp	8,9	8,9	9,2	9,9	9,4	8,5
	p	0,809		0,946		0,783	

3.2.1.3. Respiração de oxigénio

São vários os mecanismos mencionados na literatura que visam explicar a redução de perfusão associada à hiperóxia. A maioria dos autores aponta para uma inativação do NO pelas espécies reativas de oxigénio (*reactive oxygen species* - ROS) criadas em maior quantidade durante o período hiperóxico, diminuindo a sua ação vasodilatadora⁽²⁵³⁾. Estão também mencionados o aumento da produção de endotelina-1^(45, 46) e para uma modificação do tónus simpático⁽²³⁸⁾. Outros estudos propõem um papel do citocromo P450 4A. Este citocromo é encontrado nas células musculares lisas das arteríolas e parece atuar como um sensor do nível de oxigénio^(254, 255). Catalisa a formação de 20-HETE (ácido 20-hidroxeicosatetraenóico) a partir de ácido araquidónico (AA) a uma taxa que é dependente da pO_2 ⁽²⁵⁶⁾. Dados recentes mostraram que a hiperóxia induz a produção vascular de 20-HETE⁽²⁵⁷⁾. Um dos moduladores fisiológicos da formação de 20-HETE é o próprio NO, que inibe tonicamente esta produção^(258, 259). Portanto, especula-se que durante a hiperóxia o aumento da concentração de 20-HETE se deva à ausência de inibição pelo NO. Por sua vez, o

20-HETE leva a cabo um efeito constritor, provavelmente por modulação da atividade miogénica⁽²⁶⁰⁾.

Notou-se o aumento significativo da atividade cardíaca ($p=0,039$) durante a fase de provocação, o que pode ser atribuído a uma estimulação simpática cardíaca de origem ansiogénica, provavelmente associada à experiência incomum de respiração a partir de uma máscara. Notou-se um aumento significativo da componente respiratória durante a fase de provocação ($p<0,001$), provavelmente devida ao aumento da transmissão à circulação periférica das oscilações hemodinâmicas associadas ao aumento da ventilação. Verificou-se uma diminuição não significativa das componentes simpática e ambas as componentes endoteliais. Estes resultados suportam outros previamente publicados que mencionam que a hiperóxia bloqueia os efeitos do sistema nervoso simpático sobre a vasculatura e a produção endotelial de vasodilatadores como o NO e prostaglandinas^(238, 253). Notou-se ainda o aumento significativo da componente miogénica ($p=0,035$). Sabe-se que o aumento desta atividade provoca, segundo a lei de Poiseuille, a diminuição da resistência vascular e, portanto, vasodilatação⁽²⁶¹⁾. Como tal, supõe-se que o aumento da atividade miogénica não seja, nestas condições, atribuída ao eventual aumento da secreção de 20-HETE. Sabe-se também que a atividade miogénica sofre forte modulação por parte dos mediadores vasoativos de origem endotelial. De facto, tanto o NO como outros vasodilatadores diminuem o tónus miogénico^(262, 263). Uma vez que se verificou um aumento da atividade independente de NO mas uma diminuição da dependente de NO, supõe-se que seja esta última a responsável pelo aumento da atividade miogénica.

Assim sendo, a redução de perfusão / vasoconstricção induzida pela hiperóxia poderá aparentemente ser explicada pela redução das atividades endoteliais, ainda que desprovida de significância estatística.

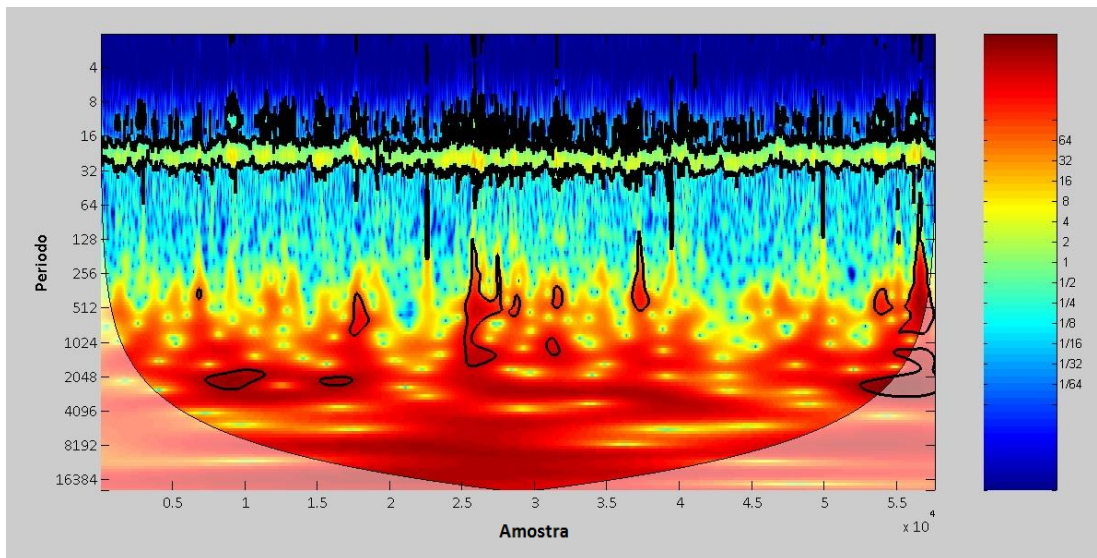


Figura 40. Escalograma do sinal de LDF de um indivíduo representativo (#27, masculino, 23 anos) durante os 30 minutos do protocolo de respiração de oxigênio a 100%.

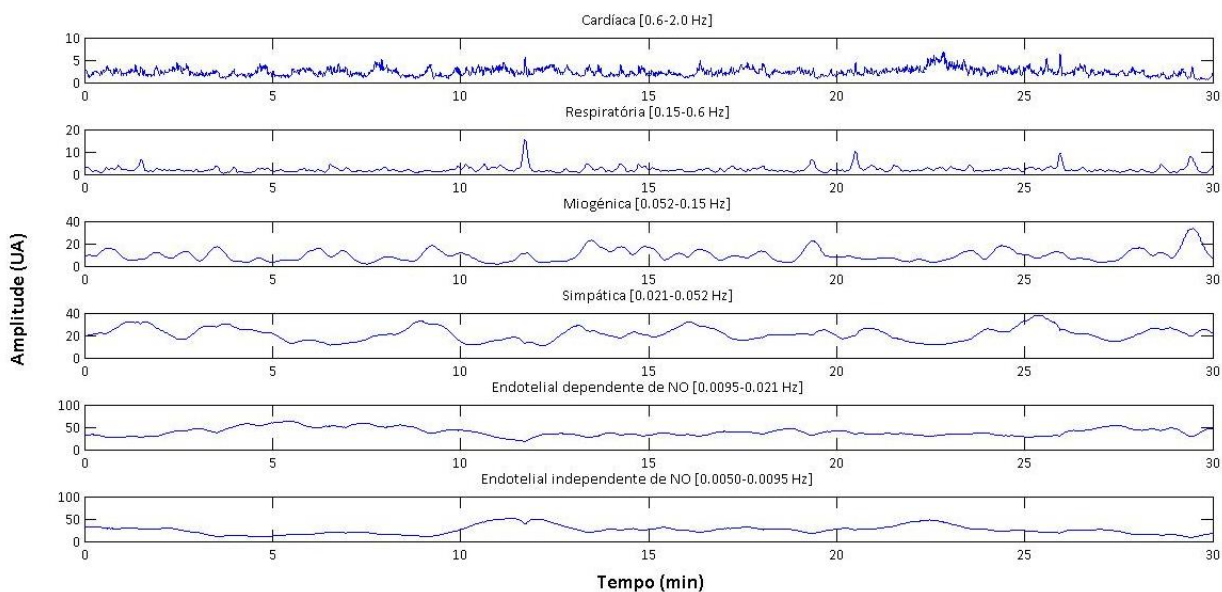


Figura 41. Evolução da amplitude (expressa em unidades arbitrárias) de cada componente do sinal de LDF de um indivíduo representativo (#27, masculino, 23 anos) ao longo dos 30 minutos do protocolo de oxigênio a 100%.

Tabela 26. Média e desvio-padrão (dp) do rácio de amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% (N=65). Comparação estatística com a fase de estabilização (p<0,05; * - estatisticamente significativo).

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Cardíaca	média	2,6	2,9	2,5
	dp	1,5	1,6	1,3
	p	-	0,039*	0,600
Respiratória	média	4,3	5,8	4,5
	dp	2,7	3,3	2,7
	p	-	<0,001*	0,603
Miogénica	média	12,4	13,6	12,3
	dp	4,6	5,2	4,3
	p	-	0,035*	0,538
Simpática	média	19,4	18,8	18,5
	dp	5,1	5,2	4,4
	p	-	0,654	0,262
Endotelial dependente de NO	média	28,7	27,6	28,2
	dp	6,8	5,8	6,6
	p	-	0,286	0,218
Endotelial independente de NO	média	32,6	31,3	34,0
	dp	9,8	8,9	7,9
	p	-	0,334	0,193

3.2.1.3.1. Comparação de grupos

Na fase de estabilização, o grupo 2 apresentou níveis de atividade cardíaca, respiratória, miogénica e endotelial independente de NO superiores às do grupo 1 e níveis de atividade simpática e endotelial dependente de NO inferiores. Nenhuma destas diferenças foi significativa. Durante a fase de provocação as tendências de alteração das componentes foram semelhantes nos dois grupos à exceção da componente simpática, que diminuiu no grupo 1 e aumentou no grupo 2. Durante a fase de recuperação não foram detetadas diferenças significativas entre as componentes. Apesar de útil para explorar os mecanismos associados a determinadas variações do sinal de LDF, a WT não se revelou útil para detetar diferenças entre os dois grupos de indivíduos.

Tabela 27. Média \pm desvio-padrão do rácio de amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% para os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Rácio de amplitude		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Cardíaca	média	2,6	2,8	2,8	3,0	2,8	2,6
	dp	1,4	1,5	1,7	1,4	1,7	1,4
	p	0,594		0,543		0,561	
Respiratória	média	4,1	4,6	5,3	6,5	4,0	4,6
	dp	2,0	3,4	2,1	4,2	1,7	2,5
	p	0,683		0,426		0,729	
Miogénica	média	12,3	12,6	13,5	13,7	12,3	11,9
	dp	3,8	5,5	5,5	4,9	3,5	4,2
	p	0,906		0,704		0,485	
Simpática	média	19,8	18,5	18,8	18,7	19,0	18,2
	dp	4,2	4,7	4,9	5,6	4,1	4,3
	p	0,077		0,750		0,326	
Endotelial dependente de NO	média	29,2	28,6	27,8	27,4	28,1	27,1
	dp	6,5	6,9	5,6	6,1	5,4	5,1
	p	0,643		0,890		0,361	
Endotelial independente de NO	média	32,0	33,0	31,8	30,6	34,1	35,6
	dp	8,8	9,4	9,0	8,9	7,9	8,4
	p	0,604		0,699		0,434	

3.2.1.3.2. Comparações de sexos

Durante a fase de estabilização, as mulheres apresentaram uma atividade cardíaca significativamente mais elevada que os homens ($p=0,045$), o que poderá ser atribuído a uma possível elevação da frequência cardíaca de causa ansiogénica. As mulheres apresentaram ainda atividades simpática e endotelial dependente de NO superiores às dos homens, mas sem significância estatística. As diferenças observadas na atividade simpática estão de acordo com o conhecimento de que as mulheres apresentam maior tónus vascular simpático⁽²⁴³⁾. Durante a fase de provocação os homens apresentaram uma atividade miogénica significativamente mais elevada que as mulheres ($p=0,004$). Estes resultados sugerem que a resposta à respiração de oxigénio a 100% pode ser distinguida entre sexos quanto à resposta miogénica. Nenhuma outra diferença foi notada nas restantes componentes do sinal de LDF durante a fase de provocação. Durante a fase de recuperação não foram notadas quaisquer diferenças significativas entre sexos.

Tabela 28. Média \pm desvio-padrão do rácio de amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% para os sexos feminino e masculino. Comparação entre os sexos para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Componente		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino
Cardíaca	média	2,8	2,6	2,9	3,0	2,6	2,6
	dp	1,2	1,3	1,1	1,8	1,0	1,5
	p	0,045*		0,293		0,136	
Respiratória	média	4,9	4,7	5,5	6,4	4,6	4,7
	dp	3,3	2,9	3,0	2,7	2,3	2,4
	p	0,312		0,406		0,350	
Miogénica	média	12,8	13,1	12,1	14,6	12,1	13,0
	dp	5,6	5,6	5,2	5,8	4,3	4,8
	p	0,956		0,004*		0,858	
Simpática	média	18,6	17,5	18,0	17,0	18,1	16,8
	dp	4,2	4,6	4,8	5,0	4,2	3,9
	p	0,226		0,501		0,243	
Endotelial dependente de NO	média	28,6	26,5	27,8	26,0	28,2	26,1
	dp	7,8	6,1	5,6	6,7	5,5	6,4
	p	0,559		0,923		0,660	
Endotelial independente de NO	média	32,3	33,5	33,6	30,9	34,4	34,5
	dp	9,9	9,9	9,6	8,8	8,6	8,4
	p	0,973		0,067		0,869	

3.2.1.3.3. Comparação de respostas

Como mencionado na secção 3.1.3., dos 65 indivíduos estudados, 50 responderam com aumento de perfusão / vasoconstrição, enquanto que 15 responderam com aumento de perfusão / vasodilatação. Com o intuito de se distinguir as respostas quanto aos mecanismos envolvidos, fez-se a comparação das atividades das componentes entre as duas. Nos indivíduos que responderam com diminuição de perfusão / vasoconstrição notou-se um aumento significativo das componentes cardíaca ($p=0,02$), respiratória ($p<0,001$) e miogénica ($p=0,019$). Já as atividades simpática e endoteliais diminuíram, mas sem significância estatística. Estes resultados sugerem que a redução de perfusão causada pela hiperóxia induz uma redução na produção de vasodilatadores endoteliais, com efeito de redução de perfusão, e que se sobrepõe ao aumento da atividade miogénica, com efeito oposto.

Nos indivíduos que responderam com aumento de perfusão / vasodilatação notou-se o aumento não significativo das componentes cardíaca, respiratória, miogénica e endotelial independente de NO. Verificou-se uma redução não significativa das componentes simpática e endotelial dependente de NO. Estes resultados sugerem que nestes indivíduos a vasodilatação poderá ser explicada pelo aumento da produção de vasodilatadores como prostaglandinas, mas não pelo NO, bem como pela diminuição das eferências simpáticas. Apesar de também se verificar uma redução na atividade miogénica, que contribui para o aumento da perfusão, esta resposta também foi encontrada nos indivíduos que responderam com diminuição de perfusão, pelo que não poderá ser considerada a mais contributiva. Comparando as duas respostas, verificou-se que os indivíduos que respondem com aumento de perfusão apresentam uma atividade miogénica significativamente mais baixa durante a provocação em relação aos que respondem com constrição ($p=0.03$). Por outro lado, nos indivíduos que responderam com aumento da perfusão, a atividade endotelial independente de NO foi significativamente superior à dos indivíduos vasoconstritores ($p=0,009$). Estes resultados sugerem que os indivíduos dilatadores respondem com uma atividade miogénica menor, mas com uma maior produção de vasodilatadores endoteliais.

Tabela 29. Média \pm desvio-padrão do rácio de amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% para os indivíduos que responderam com diminuição do sinal de LDF (N=50). Comparação entre os sexos para cada fase ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Cardíaca	média	2,6	2,8	2,5
	dp	1,3	1,1	1,2
	p	-	0,020*	0,726
Respiratória	média	4,5	6,1	4,5
	dp	2,8	3,4	2,7
	p	-	<0,001*	0,785
Miogénica	média	12,8	14,2	12,5
	dp	4,7	5,1	4,4
	p	-	0,019*	0,382
Simpática	média	19,7	19,2	18,9
	dp	4,9	5,0	4,7
	p	-	0,906	0,334
Endotelial dependente de NO	média	28,2	27,9	27,6
	dp	6,2	5,7	6,4
	p	-	0,500	0,321
Endotelial independente de NO	média	32,2	29,8	34,1
	dp	9,7	7,9	8,3
	p	-	0,094	0,299

Tabela 30. Média \pm desvio-padrão do rácio de amplitude das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% para os indivíduos que responderam com aumento do sinal de LDF (N=15). Comparação entre os sexos para cada fase (p<0,05; * - estatisticamente significativo).

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Cardíaca	média	2,6	3,2	2,6
	dp	2,0	2,7	1,9
	p	-	0,929	0,533
Respiratória	média	3,4	4,8	4,3
	dp	2,2	2,8	2,8
	p	-	0,091	0,477
Miogénica	média	10,6	11,5	11,7
	dp	4,1	5,2	4,1
	p	-	1,000	0,657
Simpática	média	18,5	17,0	17,0
	dp	5,8	5,4	2,8
	p	-	0,534	0,594
Endotelial dependente de NO	média	30,9	26,6	30,7
	dp	8,8	6,2	7,0
	p	-	0,286	0,424
Endotelial independente de NO	média	34,0	36,9	33,7
	dp	10,6	10,6	6,8
	p	-	0,424	0,477

Tabela 31. Média \pm desvio-padrão do rácio de amplitude de cada componente do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% para os indivíduos que responderam com diminuição de perfusão (DP) / vasoconstrição (N=50) e com aumento de perfusão (AP) / vasodilatação (N=15). Comparação entre respostas para cada fase (p<0,05; * - estatisticamente significativo).

Componente		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		DP	AP	DP	AP	DP	AP
Cardíaca	média	2,6	2,6	2,8	3,2	2,5	2,6 \pm
	dp	1,3	1,2	1,1	2,7	1,2	1,9
	p	0,447		0,285		0,458	
Respiratória	média	4,5	3,4	6,1	4,8	4,5	4,3
	dp	2,8	2,2	3,4	2,8	2,7	2,8
	p	0,324		0,103		0,463	
Miogénica	média	12,8	10,6	14,2	11,5	12,5	11,7
	dp	4,7	4,1	5,1	5,2	4,4	4,1
	p	0,205		0,030*		0,474	
Simpática	média	19,7	18,5	19,2	17,0	18,9	17,0
	dp	4,9	5,8	5,0	5,4	4,7	2,8
	p	0,277		0,099		0,166	
Endotelial dependente de NO	média	28,2	30,9	27,9	26,6	27,6	30,7
	dp	6,2	8,8	5,7	6,2	6,4	7,0
	p	0,395		0,550		0,526	
Endotelial independente de NO	média	32,2	34,0	29,8	36,9	34,1	33,7
	dp	9,7	10,6	7,9	10,6	8,3	6,8
	p	0,828		0,009*		0,480	

A WT permitiu identificar os determinantes de perfusão em cada uma das três manobras dinâmicas aplicadas ao modelo humano:

- no protocolo de elevação passiva da perna, mostrou, durante a provocação, o aumento das atividades cardíaca e endotelial independente de NO, bem como a diminuição das atividades respiratória, miogénica, simpática e endotelial dependente de NO. Mostrou ainda existir uma atividade endotelial independente de NO reduzida nos indivíduos mais velhos face aos mais jovens;

- no protocolo de oclusão supra-sistólica, mostrou, durante a provocação, uma redução das atividades de todas as componentes, à exceção das endoteliais;

- no protocolo de respiração de oxigénio, mostrou, durante a provocação, um aumento das atividades cardíaca, respiratória e miogénica, mas uma redução das atividades simpática e endoteliais. Mostrou ainda que a redução de perfusão / vasoconstrição encontrada parece dever-se à redução de ambas as atividades endoteliais, enquanto que o aumento de perfusão / vasodilatação se parece dever ao aumento da atividade endotelial independente de NO.

3.2.2. *Análise de Flutuação Retificada (DFA)*

3.2.2.1. Elevação passiva da perna

Na fase de estabilização, o sinal de LDF não processado, bem como todas as suas componentes, apresentaram expoentes alfa com valores superiores a 0,5, o que significa que todos estes sinais apresentam autocorrelações positivas. O sinal não processado e as suas componentes cardíaca e respiratória apresentaram expoentes alfa com um valor aproximadamente igual a 1,0, o que sugere um comportamento semelhante a um ruído do tipo 1/f (ruído cor de rosa – *pink noise*). Este comportamento é caracterizado por uma relação de proporcionalidade inversa entre a densidade de potência espectral e a frequência do sinal. Estes resultados estão de acordo com resultados publicados, e que identificaram valores semelhantes do expoente alfa para o sinal de LDF⁽¹⁷¹⁾. Este comportamento fractal

do tipo $1/f$ foi igualmente identificado em sinais de frequência cardíaca, frequência respiratória, pressão arterial e eletroencefalografia^(264, 265). Está estabelecido que sinais que apresentem um comportamento $1/f$ resultam da interação de vários sistemas de controle fisiológico que atuam a diferentes escalas temporais, que lhes confere resiliência e adaptabilidade. Já as componentes miogénica, simpática e ambas as endoteliais apresentaram expoentes alfa com valores próximos de 1,5, sugerindo um comportamento semelhante ao do ruído browniano (ruído vermelho). Este comportamento é caracterizado por uma relação de proporcionalidade inversa entre a densidade de potência espectral e o quadrado da frequência do sinal.

Durante a fase de provocação verificou-se uma diminuição significativa do expoente alfa do sinal de LDF ($p=0,009$), fazendo-o adquirir características mais próximas de um ruído branco ($\alpha=0,5$). Esta diminuição pode dever-se à alteração da atuação dos mecanismos de regulação de perfusão local. Já para as componentes cardíaca e respiratória, o valor do expoente alfa aumentou significativamente ($p<0,001$ em ambos os casos), fazendo os sinais adotar características mais próximas do ruído browniano. Os expoentes alfa das componentes miogénica e ambas as endoteliais aumentaram, mas só de forma significativa para a endotelial dependente de NO ($p=0,004$), o que sugere uma alteração nesta atividade. Já o expoente alfa do componente simpático diminuiu de forma não significativa.

Os expoentes alfa do sinal de LDF não processado e de todas as suas componentes tenderam a retornar aos valores da fase de estabilização. No entanto, verificou-se uma diferença significativa para o sinal de LDF ($p=0,009$), para a componente cardíaca ($p=0,035$) e para a componente endotelial independente de NO ($p=0,037$). Estas diferenças sugerem uma alteração na atividade dos sistemas que regulam as atividades mencionadas na fase de recuperação face à de estabilização.

Tabela 32. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e das suas componentes nas três fases do protocolo de elevação passiva da perna. Comparação com a fase de estabilização ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Sinal de LDF	média	1,04	0,94	0,96
	dp	0,18	0,21	0,16
	p	-	0,009*	0,009*
Cardíaca	média	0,96	1,11	0,91
	dp	0,16	0,17	0,13
	p	-	<0,001*	0,035*
Respiratória	média	1,01	1,12	0,98
	dp	0,10	0,13	0,10
	p	-	<0,001*	0,065
Miogénica	média	1,45	1,49	1,43
	dp	0,10	0,14	0,11
	p	-	0,127	0,270
Simpática	média	1,66	1,61	1,65
	dp	0,12	0,14	0,10
	p	-	0,057	0,556
Endotelial dependente de NO	média	1,61	1,70	1,63
	dp	0,15	0,17	0,13
	p	-	0,004*	0,426
Endotelial independente de NO	média	1,60	1,65	1,66
	dp	0,15	0,16	0,16
	p	-	0,072	0,037*

3.2.2.1.1. Comparação de grupos

Os valores dos expoentes alfa para o sinal de LDF e suas componentes foram semelhantes entre os dois grupos de indivíduos nas três fases do protocolo de oclusão. A única diferença estatística revelada foi para a componente respiratória durante a fase de provocação, na qual o expoente alfa foi significativamente maior no grupo 1. Tal pode dever-se à diferente atuação dos mecanismos que influenciam a frequência e profundidade respiratória.

Tabela 33. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de elevação da perna entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Expoente alfa		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Sinal de LDF	média	1,04	1,03	0,98	0,89	0,96	0,97
	dp	0,20	0,16	0,23	0,17	0,16	0,16
	p	0,599		0,111		0,726	
Cardíaca	média	0,94	0,98	1,13	1,08	0,91	0,90
	dp	0,15	0,17	0,17	0,18	0,13	0,14
	p	0,418		0,184		0,589	
Respiratória	média	1,01	1,02	1,18	1,06	0,97	1,00
	dp	0,10	0,11	0,11	0,12	0,09	0,11
	p	0,442		0,001*		0,308	
Miogénica	média	1,47	1,44	1,51	1,46	1,43	1,43
	dp	0,11	0,10	0,16	0,13	0,10	0,13
	p	0,211		0,426		0,893	
Simpática	média	1,66	1,66	1,63	1,59	1,66	1,64
	dp	0,12	0,12	0,15	0,12	0,10	0,11
	p	0,925		0,430		0,585	
Endotelial dependente de NO	média	1,60	1,62	1,74	1,66	1,62	1,64
	dp	0,14	0,16	0,18	0,16	0,14	0,12
	p	0,862		0,092		0,479	
Endotelial independente de NO	média	1,59	1,62	1,67	1,63	1,69	1,62
	dp	0,16	0,13	0,14	0,18	0,17	0,15
	p	0,351		0,509		0,059	

3.2.2.1.2. Comparação de sexos

Os expoentes alfa do sinal de LDF e das suas componentes foram semelhantes entre sexos nas três fases do protocolo. A única diferença estatística verificada foi na fase de recuperação para a componente respiratória, revelando os indivíduos do sexo masculino um expoente alfa significativamente menor ($p = 0,002$), o que sugere que os mecanismos de controlo da função cardíaca pós-provocação parecem ser diferentes entre sexos. De um modo geral a análise de DFA não revelou diferenças expressivas no comportamento fractal do sinal de LDF e suas componentes entre sexos.

Tabela 34. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de elevação da perna entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os sexos feminino e masculino para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Expoente alfa		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino
Sinal de LDF	média	1,08	1,00	0,90	0,98	0,98	0,95
	dp	0,16	0,19	0,21	0,20	0,15	0,16
	p	0,078		0,280		0,596	
Cardíaca	média	0,99	0,92	1,09	1,13	0,96	0,86
	dp	0,15	0,16	0,18	0,17	0,14	0,11
	p	0,068		0,485		0,002*	
Respiratória	média	1,02	1,00	1,15	1,10	0,98	0,99
	dp	0,11	0,10	0,13	0,13	0,09	0,10
	p	0,350		0,111		0,882	
Miogénica	média	1,44	1,46	1,52	1,46	1,43	1,42
	dp	0,09	0,12	0,16	0,12	0,11	0,11
	p	0,572		0,164		0,702	
Simpática	média	1,67	1,65	1,60	1,63	1,66	1,63
	dp	0,13	0,10	0,15	0,13	0,09	0,12
	p	0,248		0,256		0,214	
Endotelial dependente de NO	média	1,63	1,59	1,71	1,70	1,64	1,61
	dp	0,15	0,14	0,18	0,17	0,13	0,13
	p	0,232		0,768		0,310	
Endotelial independente de	média	1,58	1,62	1,66	1,64	1,68	1,64
	dp	0,16	0,13	0,17	0,16	0,17	0,16
	p	0,493		0,762		0,256	

3.2.2.2. Oclusão supra-sistólica

Na fase de estabilização, os valores dos expoentes alfa do sinal de LDF bruto e suas componentes foram semelhantes aos encontrados no protocolo de elevação passiva da perna. O sinal de LDF e as componentes cardíaca e respiratória apresentaram valores de alfa próximos de 1,0, refletindo fenómenos do tipo 1/f, enquanto que as restantes componentes apresentaram valores próximos de 1,5, refletindo fenómenos com um comportamento browniano. Na fase de oclusão o expoente alfa do sinal de LDF não processado aumentou significativamente ($p=0,014$), bem como os das componentes respiratória ($p<0,001$), miogénica ($p<0,001$), simpática ($p<0,001$) e endotelial independente de NO ($p<0,001$). As

componentes cardíaca e endotelial dependentes de NO foram as únicas cujos expoentes alfa não aumentaram de modo significativo. O sinal de LDF registrado durante oclusão é devido largamente pelo movimento browniano das hemácias aprisionadas, o que pode explicar o aumento dos expoentes alfa do sinal de LDF e das componentes cardíaca e respiratória para valores mais próximos dos do ruído browniano. Na fase de recuperação verificou-se a tendência de retorno aos valores da fase de estabilização, não se tendo verificado diferenças significativas entre as duas fases senão para a componente respiratória ($p=0,045$).

Tabela 35. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e das suas componentes nas três fases do protocolo de oclusão supra-sistólica. Comparação com a fase de estabilização ($p<0,05$); * - estatisticamente significativo.

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Sinal LDF	média	1,04	1,14	1,03
	dp	0,20	0,19	0,21
	p	-	0,014*	0,530
Cardíaca	média	0,98	1,04	0,96
	dp	0,16	0,19	0,15
	p	-	0,055	0,752
Respiratória	média	1,10	1,27	1,05
	dp	0,13	0,15	0,10
	p	-	<0,001*	0,045*
Miogénica	média	1,48	1,61	1,46
	dp	0,12	0,18	0,11
	p	-	<0,001*	0,074
Simpática	média	1,67	1,81	1,66
	dp	0,13	0,17	0,13
	p	-	<0,001*	0,899
Endotelial dependente de NO	média	1,67	1,74	1,62
	dp	0,15	0,23	0,18
	p	-	0,087	0,112
Endotelial independente de NO	média	1,65	1,79	1,63
	dp	0,13	0,16	0,16
	p	-	<0,001*	0,312

3.2.2.2.1. Comparação de grupos

Os expoentes alfa foram semelhantes entre os dois grupos na fase de estabilização. Todas as componentes se alteraram no mesmo sentido na fase de provocação. Na fase de provocação a única diferença significativa encontrada foi para a componente endotelial independente de NO, que apresentou um expoente alfa superior no grupo 2 ($p=0,007$). Já na fase de recuperação não se encontraram diferenças significativas entre grupos, o que sugere uma recuperação dos mecanismos de regulação.

Tabela 36. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de oclusão supra-sistólica entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Expoente alfa		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Sinal de LDF	média	1,05	1,04	1,17	1,10	1,03	1,03
	dp	0,21	0,18	0,22	0,14	0,21	0,22
	p	0,930		0,138		0,751	
Cardíaca	média	0,98	0,98	1,07	1,01	0,94	0,99
	dp	0,18	0,14	0,19	0,19	0,14	0,16
	p	0,962		0,220		0,121	
Respiratória	média	1,08	1,11	1,28	1,25	1,06	1,05
	dp	0,15	0,12	0,14	0,17	0,09	0,12
	p	0,369		0,345		0,720	
Miogénica	média	1,47	1,50	1,63	1,59	1,47	1,45
	dp	0,13	0,10	0,17	0,19	0,11	0,11
	p	0,641		0,331		0,454	
Simpática	média	1,67	1,67	1,78	1,85	1,67	1,65
	dp	0,11	0,14	0,18	0,16	0,12	0,15
	p	0,761		0,126		0,445	
Endotelial dependente de NO	média	1,65	1,69	1,78	1,69	1,61	1,64
	dp	0,14	0,17	0,21	0,25	0,18	0,18
	p	0,230		0,169		0,548	
Endotelial independente de NO	média	1,66	1,63	1,75	1,85	1,63	1,62
	dp	0,12	0,15	0,17	0,12	0,15	0,18
	p	0,526		0,007*		0,761	

3.2.2.2. Comparação de sexos

Os expoentes alfa do sinal de LDF e das suas componentes apresentaram-se mais elevados nos indivíduos do sexo masculino durante a fase de estabilização, à exceção da componente endotelial independente de NO. No entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas. Durante a fase de provocação, verificaram-se, pelo contrário, valores de expoente alfa mais elevados nos indivíduos do sexo feminino, à exceção da componente miogénica, mas igualmente sem significância estatística. Na fase de recuperação, o sinal de LDF e as componentes cardíaca, respiratória e endotelial dependente de NO apresentaram novamente expoentes alfa mais elevados nos indivíduos do sexo masculino, enquanto que o oposto foi encontrado para a componente simpática. Novamente, estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Tabela 37. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de oclusão supra-sistólica entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os sexos feminino e masculino para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Expoente alfa		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino
Sinal de LDF	média	1,03	1,06	1,15	1,13	1,02	1,04
	dp	0,19	0,20	0,18	0,20	0,23	0,19
	p	0,541		0,577		0,856	
Cardíaca	média	0,96	1,00	1,05	1,03	0,96	0,97
	dp	0,15	0,16	0,18	0,20	0,16	0,14
	p	0,214		0,629		0,648	
Respiratória	média	1,07	1,12	1,27	1,26	1,05	1,06
	dp	0,14	0,12	0,17	0,13	0,11	0,10
	p	0,204		0,687		0,444	
Miogénica	média	1,47	1,49	1,61	1,62	1,46	1,46
	dp	0,12	0,12	0,19	0,17	0,10	0,12
	p	0,638		0,888		0,962	
Simpática	média	1,64	1,69	1,81	1,80	1,67	1,66
	dp	0,13	0,12	0,17	0,18	0,14	0,13
	p	0,107		0,909		0,882	
Endotelial dependente de NO	média	1,64	1,70	1,79	1,68	1,59	1,66
	dp	0,16	0,14	0,22	0,23	0,16	0,19
	p	0,271		0,077		0,121	
Endotelial independente de NO	média	1,65	1,65	1,80	1,79	1,63	1,63
	dp	0,12	0,14	0,15	0,17	0,17	0,15
	p	0,893		0,995		0,712	

3.2.2.3. Respiração de oxigénio

Os expoentes do sinal de LDF não processado e dos sinais das componentes cardíaca e respiratória são muito próximos de 1,0, o que significa que apresentam um comportamento do tipo 1/f. Já os sinais miogénico, simpático e endoteliais apresentam expoentes próximos de 1,5, traduzindo processos fisiológicos com características próximas das do ruído Browniano. O expoente alfa do sinal de LDF diminui significativamente entre as fases de estabilização e provocação ($p < 0,001$). A única componente cujo expoente alfa também diminuiu significativamente foi a cardíaca ($p < 0,039$). Não foram encontradas diferenças significativas nas restantes componentes.

Tabela 38. Média e desvio-padrão (dp) dos expoentes alfa do sinal de LDF e das respetivas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100%. Comparação estatística com a fase de estabilização ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Sinal LDF	média	1,02	0,95	1,09
	dp	0,19	0,19	0,17
	p	-	$<0,001^*$	0,098
Cardíaca	média	0,96	0,90	0,98
	dp	0,22	0,13	0,18
	p	-	0,039*	0,224
Respiratória	média	1,09	1,08	1,07
	dp	0,09	0,14	0,11
	p	-	0,273	0,339
Miogénica	média	1,42	1,45	1,44
	dp	0,14	0,08	0,13
	p	-	0,982	0,484
Simpática	média	1,68	1,63	1,70
	dp	0,12	0,13	0,12
	p	-	0,407	0,262
Endotelial dependente de NO	média	1,62	1,57	1,62
	dp	0,14	0,16	0,16
	p	-	0,340	0,347
Endotelial independente de NO	média	1,63	1,56	1,62
	dp	0,19	0,16	0,16
	p	-	0,367	0,477

3.2.2.3.1. Comparação de grupos

Os expoentes alfa apresentaram valores semelhantes entre os dois grupos nas três fases do protocolo. Em ambos os grupos os expoentes sofreram alterações não significativas entre fases, pelo que, nestas condições, os dois grupos não puderam ser distinguidos com base nas propriedades fractais dos sinais de LDF.

Tabela 39. Média \pm desvio-padrão do expoente alfa do sinal de LDF e respetivas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% para os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Expoente alfa		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Sinal de LDF	média	1,02	1,02	0,91	0,95	1,04	1,09
	dp	0,14	0,19	0,15	0,19	0,15	0,17
	p	0,485		0,184		0,281	
Cardíaca	média	0,93	0,96	0,87	0,90	0,94	0,98
	dp	0,15	0,22	0,15	0,13	0,14	0,18
	p	0,632		0,306		0,104	
Respiratória	média	1,09	1,09	1,06	1,08	1,08	1,07
	dp	0,10	0,09	0,12	0,14	0,10	0,11
	p	0,809		0,574		0,589	
Miogénica	média	1,45	1,42	1,43	1,45	1,46	1,44
	dp	0,09	0,14	0,13	0,08	0,10	0,13
	p	0,162		0,426		0,272	
Simpática	média	1,65	1,68	1,65	1,63	1,68	1,70
	dp	0,14	0,12	0,15	0,13	0,12	0,12
	p	0,322		0,375		0,387	
Endotelial dependente de NO	média	1,62	1,62	1,64	1,57	1,65	1,62
	dp	0,14	0,14	0,13	0,16	0,16	0,16
	p	0,868		0,082		0,387	
Endotelial independente de NO	média	1,58	1,63	1,58	1,56	1,62	1,62
	dp	0,16	0,19	0,15	0,16	0,14	0,16
	p	0,110		0,687		0,719	

3.2.2.3.2. Comparação de sexos

Os expoentes alfa apresentaram valores semelhantes entre os dois sexos na fase de estabilização. Durante a fase de provocação as componentes cardíaca e endotelial independente de NO apresentaram valores significativamente mais baixos nos indivíduos do sexo masculino (p cardíaca = 0,050; p endotelial independente de NO = 0,041), sugerindo diferenças na atividade destes mecanismos entre sexos. Durante a fase de recuperação não foram novamente encontradas diferenças entre sexos, sugerindo um retorno semelhante à atividade basal em ambos os sexos.

Tabela 40. Média \pm desvio-padrão do expoente alfa do sinal de LDF e respectivas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigênio a 100% para os sexos feminino e masculino. Comparação entre os sexos para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Expoente alfa		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino
Sinal LDF	média	1,00	1,04	0,96	0,90	1,04	1,09
	dp	0,18	0,15	0,19	0,14	0,17	0,14
	p	0,417		0,125		0,286	
Cardíaca	média	0,90	0,98	0,92	0,85	0,93	0,99
	dp	0,20	0,16	0,13	0,15	0,17	0,13
	p	0,082		0,050*		0,245	
Respiratória	média	1,08	1,10	1,07	1,07	1,06	1,09
	dp	0,09	0,10	0,12	0,13	0,10	0,11
	p	0,421		0,962		0,559	
Miogénica	média	1,45	1,42	1,45	1,42	1,45	1,45
	dp	0,11	0,12	0,10	0,12	0,13	0,10
	p	0,429		0,245		0,972	
Simpática	média	1,66	1,67	1,66	1,62	1,66	1,72
	dp	0,14	0,12	0,11	0,16	0,14	0,10
	p	0,783		0,308		0,141	
Endotelial dependente de NO	média	1,64	1,60	1,61	1,60	1,60	1,67
	dp	0,13	0,14	0,14	0,16	0,18	0,13
	p	0,304		0,863		0,161	
Endotelial independente de NO	média	1,60	1,60	1,62	1,53	1,61	1,62
	dp	0,17	0,17	0,13	0,17	0,17	0,13
	p	0,842		0,041*		0,896	

A DFA permitiu encontrar diferentes comportamentos fractais nos sinais de LDF e suas componentes, independente do teste dinâmico durante o qual foram registados. As componentes cardíaca e respiratória apresentaram um comportamento $1/f$, enquanto que a miogénica, a simpática e as endoteliais apresentaram um comportamento próximo do browniano. Mostrou, sobretudo, que o comportamento fractal dos sinais se altera em diferentes sentidos em diferentes testes aplicados, à semelhança de outros estudos já publicados^(170, 171).

- durante a elevação passiva da perna, o expoente alfa do sinal de LDF e da sua componente simpática sofre uma diminuição, enquanto que o das restantes componentes sofre um aumento;
- durante a oclusão supra-sistólica, o expoente alfa do sinal de LDF e de todas as suas componentes sofre um aumento. Mostrou, ainda, que indivíduos mais velhos apresentam expoentes alfa da componente endotelial independente de NO menores que os de indivíduos jovens;
- durante a respiração de oxigénio o expoente alfa do sinal de LDF e das componentes cardíaca e endoteliais sofreu uma diminuição, enquanto as restantes sofreu um aumento.

3.2.3. *Análise de entropia à multiescala (MSE)*

3.2.3.1. Elevação passiva da perna

A tabela 41 mostra os valores do IC do sinal de LDF não processado e de cada uma das suas componentes. O sinal não processado apresentou um valor de IC superior aos valores das suas componentes. A componente que apresentou maior IC é a cardíaca, diminuindo os valores à medida que se consideram componentes de frequência progressivamente menor. Constata-se, portanto, que a complexidade das componentes depende da frequência da mesma. Durante a fase de provocação o IC do sinal bruto sofreu um aumento significativo ($p < 0,001$). Já o IC de todas as componentes sofreu uma diminuição, sendo significativa para as componentes cardíaca ($p < 0,001$), respiratória ($p < 0,001$), simpática ($p < 0,001$) e endotelial dependente de NO ($p < 0,001$). Estes resultados sugerem que a entropia do sinal bruto e das componentes não é exclusivamente dependente do rácio da amplitude de cada componente.

O IC do sinal bruto sofreu um aumento da fase de provocação para a fase de recuperação, mas permaneceu significativamente inferior que o da fase de estabilização ($p < 0,001$). Já o IC de todas as componentes sofreu um aumento da fase de provocação para a fase de recuperação, mas permaneceu significativamente inferior ao valor de estabilização (p cardíaca $< 0,001$, p respiratória $< 0,001$, p miogénica $< 0,001$, p simpática $= 0,002$, p endotelial dependente de NO $< 0,001$, p endotelial independente de NO $< 0,001$).

Tabela 41. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e das suas componentes nas três fases do protocolo de elevação da perna. Comparação com a fase de estabilização ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Sinal de LDF	média	39,17	47,58	22,08
	dp	11,38	12,13	10,99
	p	-	<0,001*	<0,001*
Cardíaca	média	35,74	21,60	27,74
	dp	8,89	9,18	8,00
	p	-	<0,001*	<0,001*
Respiratória	média	16,38	11,22	12,53
	dp	3,52	4,47	3,55
	p	-	<0,001*	<0,001*
Miogénica	média	6,86	5,09	6,37
	dp	1,79	2,83	2,05
	p	-	0,181	<0,001*
Simpática	média	4,65	3,46	3,71
	dp	1,95	2,04	1,67
	p	-	<0,001*	0,002*
Endotelial dependente de NO	média	5,83	3,85	4,05
	dp	3,02	2,64	1,95
	p	-	0,001*	<0,001*
Endotelial independente de NO	média	5,59	4,79	3,63
	dp	3,14	2,60	2,55
	p	-	0,086	<0,001*

3.2.3.1.1. Comparação de grupos

Na fase de estabilização, o sinal de LDF apresentou um valor de IC significativamente mais baixo no grupo 2 ($p=0,050$). Durante a provocação, o grupo 2 apresentou valores de IC mais baixos para o sinal de LDF em bruto ($p=0,011$), mas valores de IC superiores para as componentes respiratória ($p=0,013$), miogénica ($p=0,001$), simpática ($p<0,001$) e endotelial dependente de NO ($p=0,050$). Na fase de recuperação, verificaram-se valores de IC superiores no grupo 2 para o sinal de LDF não processado ($p=0,009$) e para as componentes miogénica ($p=0,019$), endotelial dependente de NO ($p=0,024$) e independente de NO ($p=0,02$). Estes resultados suportam outros previamente publicados para outros sinais biológicos, no sentido em que sugerem que a entropia dos mesmos diminui com o avanço da idade⁽¹⁸⁶⁾. No entanto, estes resultados mostram também que os indivíduos mais velhos apresentam valores de entropia mais elevados durante a fase de provocação.

Tabela 42. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de elevação da perna entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Índice de complexidade		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Sinal de LDF	média	42,0	35,8	51,2	43,2	18,7	26,1
	dp	11,0	11,1	12,7	9,9	10,7	10,1
	p	0,050*		0,011*		0,009*	
Cardíaca	média	37,3	33,8	20,7	22,7	26,2	29,6
	dp	8,1	9,5	10,1	8,0	8,5	7,0
	p	0,078		0,212		0,083	
Respiratória	média	16,7	16,0	10,0	12,7	12,4	12,7
	dp	3,5	3,6	4,5	4,1	4,0	3,0
	p	0,161		0,013*		0,454	
Miogénica	média	6,8	6,9	4,1	6,3	5,8	7,0
	dp	1,9	1,7	2,7	2,6	1,9	2,1
	p	0,647		0,001*		0,019*	
Simpática	média	4,6	4,7	2,7	4,4	3,5	4,0
	dp	1,9	2,0	1,8	1,9	1,8	1,5
	p	0,716		<0,001*		0,081	
Endotelial dependente de NO	média	6,1	5,5	3,4	4,5	3,6	4,6
	dp	3,2	2,8	2,6	2,6	1,8	2,0
	p	0,500		0,050*		0,024*	
Endotelial independente de NO	média	6,0	5,1	4,4	5,2	3,0	4,4
	dp	3,3	2,9	2,0	3,1	2,5	2,5
	p	0,142		0,466		0,002*	

3.2.3.1.2. Comparação de sexos

Os IC calculados para o sinal bruto e para cada componente estão apresentados na tabela 43. Durante a fase de estabilização verificou-se que o IC do sinal não processado, das componentes cardíaca e ambas as endoteliais foi mais elevado no sexo feminino. O IC das componentes respiratória, miogénica e simpática foi mais elevado no sexo masculino. No entanto, nenhuma destas diferenças foi estatisticamente significativa. Durante a fase de provocação, o sexo feminino apresentou valores de IC do sinal não processado e das componentes simpática e endotelial independente de NO mais elevados, apresentando o sexo masculino valores mais elevados para as restantes componentes. Nesta fase verificou-se uma diferença significativa – o IC da componente miogénica foi significativamente maior

no sexo masculino ($p=0.037$). Na fase de recuperação não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre sexos. Estes resultados sugerem que a entropia do sinal da componente miogénica é diferente entre sexos e, dependendo esta irregularidade dos processos biológicos, é legítimo assumir que a própria atividade miogénica apresente diferentes propriedades nos dois sexos.

Tabela 43. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de elevação da perna entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Índice de complexidade		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino
Sinal de LDF	média	40,51	37,82	49,85	45,31	22,23	21,93
	dp	12,76	9,83	12,18	11,85	12,03	10,04
	p	0,292		0,133		0,957	
Cardíaca	média	36,25	35,23	21,41	21,80	26,31	29,17
	dp	7,87	9,91	9,58	8,90	8,24	7,60
	p	0,830		0,893		0,155	
Respiratória	média	16,31	16,45	10,72	11,71	12,18	12,88
	dp	4,13	2,85	4,55	4,39	3,89	3,19
	p	0,963		0,398		0,235	
Miogénica	média	6,83	6,89	4,46	5,71	6,19	6,55
	dp	1,75	1,86	2,99	2,56	2,20	1,92
	p	0,856		0,037*		0,460	
Simpática	média	4,23	5,07	3,47	3,45	3,68	3,74
	dp	1,83	2,00	2,09	2,02	1,69	1,68
	p	0,052		1,000		0,968	
Endotelial dependente de NO	média	5,95	5,70	3,79	3,90	4,40	3,69
	dp	3,23	2,84	2,61	2,71	2,06	1,78
	p	0,788		0,904		0,140	
Endotelial independente de NO	média	6,02	5,17	5,05	4,52	4,24	3,03
	dp	3,80	2,29	2,78	2,42	3,24	1,37
	p	0,788		0,515		0,417	

3.2.3.2. Oclusão supra-sistólica

Quanto à magnitude, os valores de IC encontrados ordenam-se da seguinte forma: cardíaco > não processado > respiratória > miogénica > simpática > endotelial independente de NO > endotelial dependente de NO. O valor de IC quer do sinal não processado, quer das componentes sofreu uma redução muito significativa ($p < 0,001$ para todos os casos) da fase de estabilização para a fase de provocação. Esta diminuição deve-se provavelmente à redução da irregularidade do sinal de LDF durante a provocação. De facto, nesta fase, o sinal de LDF não reflete o normal fluxo sanguíneo, mas sim o movimento browniano das hemácias. Os IC dos sinais não processado e componentes aumentaram durante a recuperação, mas não foram significativamente diferentes dos valores de estabilização, com a exceção da componente endotelial independente de NO, cujo IC foi significativamente mais elevado ($p = 0,002$), traduzindo uma maior irregularidade deste processo.

Tabela 44. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e das suas componentes nas três fases do protocolo de oclusão supra-sistólica. Comparação com a fase de estabilização ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Índice de complexidade		Estabilização	Provocação	Recuperação
Sinal LDF	média	33,81	12,82	33,49
	dp	11,17	15,67	13,30
	p	-	$<0,001^*$	0,939
Cardíaca	média	35,88	11,38	35,45
	dp	7,73	9,76	7,71
	p	-	$<0,001^*$	0,512
Respiratória	média	13,95	3,60	13,87
	dp	2,83	3,02	3,15
	p	-	$<0,001^*$	0,792
Miogénica	média	6,92	1,40	7,17
	dp	1,99	1,47	1,91
	p	-	$<0,001^*$	0,356
Simpática	média	4,24	2,09	4,01
	dp	1,58	0,71	1,89
	p	-	$<0,001^*$	0,247
Endotelial dependente de NO	média	4,09	3,09	4,96
	dp	2,15	2,13	2,95
	p	-	0,019*	0,088
Endotelial independente de NO	média	4,23	2,64	5,16
	dp	2,19	1,00	2,99
	p	-	$<0,001^*$	0,002*

3.2.3.2.1. Comparação de grupos

Na fase de estabilização, os IC do sinal de LDF e suas componentes revelaram-se consistentemente mais elevados no grupo 2, à exceção da endotelial dependente de NO. No entanto, nenhuma destas diferenças foi significativa. Estes resultados revelam maiores níveis de complexidade nos indivíduos mais velhos e, como tal, opõem-se aos apresentados no protocolo de elevação passiva da perna, onde se encontraram IC menores no grupo 2. As discrepâncias nestas diferenças entre grupos na fase de estabilização podem dever-se ao efeito da postura, apresentado o grupo 2 maiores níveis de entropia na posição de sentado e menores em supinação. Na fase de provocação, não foram encontradas diferenças entre grupos, sugerindo que a complexidade dos sinais é semelhante durante o período de oclusão. Finalmente, na fase de recuperação, não se encontraram mais uma vez diferenças entre grupos, o que reforça a noção de ter existido uma idêntica recuperação funcional nos dois grupos.

Tabela 45. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de oclusão supra-sistólica entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Índice de complexidade		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Sinal de LDF	média	33,7	33,9	14,4	11,0	33,7	33,3
	dp	10,8	11,8	15,6	15,8	14,3	12,2
	p	0,925		0,198		0,782	
Cardíaca	média	35,5	36,4	12,2	10,4	36,7	34,0
	dp	7,6	8,0	9,0	10,6	7,4	7,9
	p	0,623		0,263		0,066	
Respiratória	média	13,7	14,2	3,7	3,5	14,0	13,8
	dp	3,3	2,2	2,5	3,6	3,1	3,2
	p	0,458		0,370		0,919	
Miogénica	média	6,8	7,0	1,2	1,7	6,8	7,6
	dp	1,9	2,1	0,8	2,0	1,9	1,9
	p	0,721		0,941		0,182	
Simpática	média	4,2	4,3	2,1	2,1	4,0	4,0
	dp	1,6	1,5	0,7	0,7	1,9	1,9
	p	0,808		0,898		0,746	
Endotelial dependente de NO	média	4,1	4,1	2,7	3,6	5,4	4,5
	dp	1,9	2,5	2,0	2,3	3,0	2,9
	p	0,526		0,180		0,131	
Endotelial independente de NO	média	3,4	4,2	2,7	2,7	5,1	5,4
	dp	1,7	2,2	0,9	1,0	2,8	3,0
	p	0,149		0,777		0,772	

3.2.3.2.2. Comparação de sexos

Os IC calculados para o sinal bruto e para cada componente estão apresentados na tabela 46. Durante a fase de estabilização não foram encontradas diferenças significativas nos valores de IC entre sexos. Durante a fase de provocação, e apesar de diminuição sofrida face à fase de estabilização, não foram encontradas diferenças significativas nos valores de IC entre sexos. Durante a fase de recuperação os valores de IC de ambos os sexos aumentaram novamente, mas mais uma vez voltaram a não se encontrar diferenças significativas entre sexos. Estes resultados sugerem que a manobra de oclusão altera de forma semelhante nos dois sexos a regularidade do sinal de LDF e das suas componentes.

Tabela 46. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de oclusão supra-sistólica entre os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Índice de complexidade		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino
Sinal de LDF	média	33,3	34,3	16,3	9,4	32,0	34,9
	dp	11,1	11,4	17,4	13,1	14,3	12,3
	p	0,835		0,068		0,398	
Cardíaca	média	35,3	36,5	12,6	10,1	34,3	36,6
	dp	7,7	7,9	10,7	8,7	7,9	7,4
	p	0,629		0,386		0,169	
Respiratória	média	14,0	13,9	4,3	2,9	14,0	13,7
	dp	3,1	2,6	3,4	2,4	3,2	3,2
	p	0,883		0,106		0,941	
Miogénica	média	7,1	6,7	1,3	1,5	7,6	6,8
	dp	2,0	2,0	1,4	1,6	2,1	1,6
	p	0,379		0,757		0,093	
Simpática	média	4,4	4,0	2,0	2,2	4,1	3,9
	dp	1,8	1,4	0,6	0,8	2,0	1,8
	p	0,550		0,240		0,428	
Endotelial dependente de NO	média	4,5	3,7	2,8	3,3	5,4	4,5
	dp	2,5	1,6	2,2	2,1	3,2	2,7
	p	0,358		0,354		0,155	
Endotelial independente de NO	média	3,6	3,9	2,5	2,9	5,8	4,7
	dp	1,9	2,0	0,7	1,1	3,2	2,5
	p	0,493		0,116		0,184	

3.2.3.3. Respiração de oxigénio

Os valores de IC do sinal de LDF e das suas componentes estão apresentados na tabela 47. Os valores do sinal não processado foram maiores que os das suas componentes, sendo que, de um modo geral, quanto menor a frequência da componente menor o seu IC. Quanto à magnitude, os valores de IC encontrados ordenam-se da seguinte forma: não processado > cardíaca > respiratória > miogénica > simpática > endotelial independente de NO > endotelial dependente de NO. Durante a fase de provocação verificou-se a diminuição significativa do IC do sinal não processado ($p < 0,001$). A análise de entropia permitiu encontrar diminuições nos níveis de entropia das componentes cardíaca ($p = 0,003$), respiratória ($p = 0,0018$) e ambas as endoteliais ($p = 0,001$ para a dependente de NO e $p = 0,006$ para a independente de NO) entre as fases de estabilização e recuperação. Tal sugere que, apesar das condições iniciais terem sido repostas em termos de valor de fluxo sanguíneo e da contribuição relativa de cada componente, a irregularidade destas componentes sofreu uma alteração na fase de recuperação.

Tabela 47. Média e desvio-padrão (dp) dos índices de complexidade das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100%. Comparação estatística com a fase de estabilização ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Índice de complexidade		Estabilização	Provocação	Recuperação
Sinal de LDF	média	45,7	34,5	41,1
	dp	51,6	34,8	44,0
	p	-	$< 0,001^*$	0,077
Cardíaca	média	35,4	34,8	31,8
	dp	7,0	8,0	8,0
	p	-	0,674	0,003*
Respiratória	média	13,9	13,9	12,4
	dp	3,1	4,0	3,4
	p	-	0,973	0,018*
Miogénica	média	7,3	7,4	6,8
	dp	2,3	2,3	1,9
	p	-	0,819	0,080
Simpática	média	4,5	4,9	3,8
	dp	2,3	2,3	1,2
	p	-	0,124	0,102
Endotelial dependente de NO	média	5,0	5,3	4,1
	dp	2,7	2,8	2,0
	p	-	0,413	0,010*
Endotelial independente de NO	média	5,5	5,8	4,2
	dp	3,3	3,5	2,3
	p	-	0,538	0,006*

3.2.3.3.1. Comparação de grupos

Os valores de IC do sinal de LDF e das suas componentes estão representados na tabela 48. Ao contrário do que foi verificado no protocolo de elevação passiva da perna, mas à semelhança do que foi verificado no protocolo de oclusão supra-sistólica, também neste protocolo se verificaram valores de IC do sinal de LDF superiores no grupo 2 durante a fase de estabilização. Tal sugere que os valores de IC do sinal de LDF apresentam uma dependência em relação à postura. Ainda durante a estabilização também os valores de IC das componentes respiratória e miogénica se apresentaram mais elevados no grupo 2. Estas diferenças não foram, no entanto, estatisticamente significativas. Durante a fase de provocação, o grupo 2 revelou valores de IC superiores aos do grupo 1 para o sinal de LDF e para todas as componentes, à exceção da respiratória, mas também sem se verificarem diferenças estatisticamente significativas. Durante a fase de recuperação voltaram a encontrar-se valores mais elevados de IC do sinal de LDF e da componente respiratória no grupo 2. A ausência de significância estatística poderá dever-se ao facto de os indivíduos dos dois grupos não apresentarem uma diferença de idades suficientemente grande entre si.

Tabela 48. Média \pm desvio-padrão do índice de complexidade do sinal de LDF e respetivas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% para os grupos 1 e 2. Comparação entre os grupos 1 e 2 para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Índice de complexidade		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Sinal de LDF	média	40,7	52,0	28,0	42,7	39,6	43,0
	dp	45,3	58,8	27,6	41,3	48,3	38,7
	p	0,287		0,089		0,251	
Cardíaca	média	36,9	33,5	34,5	35,1	32,3	31,0
	dp	6,2	7,5	9,1	6,7	9,0	6,6
	p	0,062		0,825		0,268	
Respiratória	média	13,9	14,0	14,1	13,6	12,1	12,8
	dp	3,3	3,0	3,7	4,4	3,7	3,1
	p	0,653		0,787		0,502	
Miogénica	média	7,2	7,5	7,3	7,4	6,6	7,0
	dp	2,2	2,5	2,6	1,9	1,9	1,8
	p	0,978		0,852		0,380	
Simpática	média	4,8	4,1	4,6	5,3	3,8	3,7
	dp	2,6	1,9	2,2	2,3	1,3	1,1
	p	0,218		0,242		0,825	
Endotelial dependente de NO	média	5,3	4,6	4,8	5,9	4,2	3,8
	dp	2,9	2,5	2,1	3,5	2,1	2,0
	p	0,395		0,278		0,443	
Endotelial independente de NO	média	5,8	5,0	5,3	6,5	4,3	4,1
	dp	3,2	3,5	3,1	3,9	2,4	2,1
	p	0,206		0,278		0,841	

3.2.3.3.2. Comparação de sexos

A tabela 49 apresenta os valores de IC registados em ambos os sexos no protocolo de respiração de oxigénio a 100%. O sexo feminino apresentou valores de IC superiores para o sinal de LDF e para todas as suas componentes à exceção da miogénica durante a fase de estabilização, mas sem significância estatística. Durante a fase de provocação, pelo contrário, todos os valores de IC registados foram superiores no sexo masculino, apesar de não se terem verificado diferenças estatisticamente significativas. Finalmente, durante a recuperação os valores de IC do sinal de LDF e das componentes cardíaca, respiratória e miogénica foram superiores no sexo masculino, enquanto que os valores das componentes simpática e endoteliais foram superiores no sexo feminino. Mais uma vez, estas diferenças não se revelaram estatisticamente significativas. Estes resultados sugerem que a manobra de respiração de oxigénio a 100% provoca alterações semelhantes na complexidade do sinal de LDF e das suas componentes em ambos os sexos.

Tabela 49. Média \pm desvio-padrão do Índice de complexidade do sinal de LDF e respetivas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% para os sexos feminino e masculino. Comparação entre os sexos para cada fase ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Índice de complexidade		Estabilização		Provocação		Recuperação	
		Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino
Sinal LDF	média	34,7	32,6	37,4	38,7	28,3	30,5
	dp	13,8	9,7	14,3	11,3	11,6	10,5
	p	0,700		0,670		0,417	
Cardíaca	média	35,7	35,1	33,4	36,2	29,5	33,9
	dp	6,8	7,2	7,3	8,6	8,9	6,3
	p	0,695		0,173		0,054	
Respiratória	média	14,3	13,5	13,5	14,3	11,9	12,9
	dp	3,4	2,8	4,0	4,1	3,9	2,9
	p	0,187		0,509		0,293	
Miogénica	média	7,3	7,4	6,9	7,8	6,7	6,9
	dp	2,7	2,0	2,3	2,3	1,9	1,9
	p	0,757		0,087		0,685	
Simpática	média	4,8	4,1	4,6	5,2	4,1	3,5
	dp	2,8	1,8	2,1	2,4	1,3	1,0
	p	0,361		0,336		0,082	
Endotelial dependente de NO	média	5,3	4,7	5,1	5,5	4,4	3,8
	dp	3,3	2,1	2,8	2,8	2,0	2,0
	p	0,918		0,568		0,268	
Endotelial independente de NO	média	6,0	5,0	5,3	6,3	4,3	4,1
	dp	3,9	2,6	3,4	3,5	2,2	2,3
	p	0,479		0,260		0,655	

A MSE mostrou que os sinais de LDF e os das suas componentes apresentam diferentes valores de complexidade. De um modo geral, nas fases de estabilização, a complexidade do sinal de LDF foi inferior à complexidade das componentes cardíaca e respiratória, mas superior à complexidade das componentes de atividade local. Mostrou também que os valores de complexidade se alteram durante a aplicação das manobras dinâmicas:

- durante a elevação passiva da perna, a complexidade do sinal de LDF sofre um aumento, enquanto que o de todas as suas componentes sofre uma diminuição;

- durante a oclusão supra-sistólica, a complexidade do sinal de LDF, bem como de todas as suas componentes, sofre uma diminuição;

- durante a respiração de oxigénio, a complexidade do sinal de LDF e da sua componente cardíaca sofreu uma diminuição, a da componente respiratória permaneceu inalterada, enquanto que a das componentes de atuação local sofreu um aumento;

A ordem de magnitude de IC parece depender da posição anatómica em que são feitos os registos do sinal de LDF. Na posição sentada, em que foram feitos os protocolos de oclusão supra-sistólica e de respiração de oxigénio o maior valor de IC foi encontrado para o sinal não processado, seguido imediatamente da componente cardíaca. O valor mais baixo foi registado para a componente endotelial dependente de NO. Em supinação, o maior valor de IC foi encontrado para a componente cardíaca, seguido pelo sinal não processado. O valor mais baixo foi encontrado para a componente endotelial independente de NO.

3.3. Terceiro objetivo: desenvolver um modelo animal que permita testar os instrumentos até aqui desenvolvidos, olhando mais aprofundadamente, se possível, para os fenómenos em causa

Como mencionado atrás, existem vários estudos da microcirculação periférica por LDF, no membro inferior do humano, em indivíduos saudáveis e com patologias que se manifestem ao nível microvascular. Já no que diz respeito a modelos animais, tão úteis para

a realização de estudos impraticáveis em humanos, a informação disponível na literatura é escassa. Tanto quanto é do nosso conhecimento, existem poucas publicações relativas à monitorização da microcirculação periférica de animais por LDF, mas nenhuma que tenha feito uso da respiração de oxigénio como manobra dinâmica, sobretudo em modelos de isquémia do membro posterior. Estes estudos têm, portanto, um carácter inovador no que respeita à metodologia de avaliação da microcirculação.

3.3.1. Grupo controlo

Os sinais de LDF registados nos murganhos apresentaram uma amplitude bastante superior à dos sinais registados no humano, o que se deve provavelmente ao facto de a sonda de LDF estar em contacto com vasos sanguíneos de maior calibre (ramos das artéria e veia tarsais mediais) que, como tal, contribuem com um maior desvio de Doppler.

A resposta vascular do murganho anestesiado à respiração de oxigénio a 100% não foi idêntica nos dois membros. No membro direito o fluxo sanguíneo diminuiu não significativamente, enquanto que no membro esquerdo aumentou, mas também de forma não significativa. Estes dados sugerem, à partida, que as respostas microvasculares do murganho anestesiado à respiração de oxigénio são heterogéneas entre membros. Quando se procedeu à análise da resposta de cada membro em cada murganho e de cada membro de um mesmo murganho à respiração de oxigénio, verificaram-se diversos perfis de resposta, que parecem estar na base das respostas heterogéneas encontradas quando se analisavam os membros em conjunto. Face a estes resultados, é legítimo colocar-se a hipótese desta resposta heterogénea à hiperóxia estar também presente no humano. No entanto, não existe na literatura nenhuma referência que suporte esta hipótese, no murganho ou no humano.

Tabela 50. Média \pm desvio-padrão do fluxo sanguíneo medido por LDF nos dois membros dos murganhos (N=16) nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100%. Comparação estatística com a fase de estabilização e entre membros, para cada fase ($p < 0,005$, NA – não aplicável).

Fluxo sanguíneo		Estabilização	Provocação	Recuperação	% var 1-2
Membro direito	média	139,8	135,6	163,8	- 5,2
	dp	33,6	52,4	63,2	17,8
	p	NA	0,408	0,004*	NA
Membro esquerdo	média	154,0	155,7	170,8	- 0,1
	dp	48,2	61,1	66,1	17,4
	p	NA	1,000	0,044*	NA

Procedeu-se à classificação das respostas vasculares em função dos registos de LDF e em função dos animais. Com base na sua alteração em função da provocação com oxigénio, as respostas foram classificadas como “diminuição de perfusão/vasoconstrição” e como “aumento de perfusão/vasodilatação”. Em função da forma como cada membro de um mesmo animal responde à provocação as respostas, foram classificadas como “redução bilateral de perfusão/vasoconstrição bilateral”, “aumento bilateral de perfusão/vasodilatação” e “resposta mista” (aumento de perfusão/vasodilatação num membro e diminuição de perfusão/vasoconstrição no membro contralateral).

A tabela 51 apresenta o número de registos de LDF obtidos em cada esquema de classificação. Como observado, foram registados mais casos de redução de perfusão no membro direito que no membro esquerdo (34 % vs 28 %). Já quanto à resposta de cada animal, a resposta dominante (50 %) foi a mista, seguida da redução bilateral de perfusão (~38 %) e finalmente pelo aumento bilateral de perfusão (~13 %). Estes resultados revelam uma heterogeneidade de respostas, que poderá ser explicada por eventuais diferenças na arquitetura macrovascular dos dois membros posteriores, ou pela variabilidade na arquitetura microvascular cutânea entre as regiões consideradas. Poderia ainda presumir-se que esta diferença de respostas pudesse relacionar-se com o grau de utilização de um membro dominante sobre o outro, para efeitos de locomoção, ou mesmo de destreza. Sabe-se que a locomoção e o próprio exercício físico leva a alterações morfológicas diferenciais nos membros superiores e inferiores e mesmo entre os dois lado do corpo, no

humano, que é um organismo que apresenta dominância motora ipsilateral⁽²⁶⁶⁾. As alterações vasculares podem, portanto, resultar da dominância motora. No entanto, não há dados publicados que suportem a existência de dominância ipsilateral e de consequentes diferenças a longo-termo na arquitetura vascular, quer no humano quer no murganho.

Pelo facto de se terem encontrado diferentes tipos de resposta, e com o intuito de se procurar esclarecer os mecanismos responsáveis pelos mesmos, organizaram-se os dados recolhidos em dois grupos – um grupo contendo todos os registos onde ocorreu diminuição de perfusão e um grupo contendo todos os registos onde ocorreu aumento de perfusão.

Tabela 51. Contabilização, em termos absolutos e percentuais, do número de registos de LDF em cada tipo de classificação das respostas vasculares dos animais à provocação com 100% oxigénio, para um total de 16 animais (32 membros posteriores) analisados.

Classificação em função da resposta individual de cada membro (N=32)		
Membro	Redução de perfusão	Aumento de perfusão
Direito	11 (~34 %)	5 (16 %)
Esquerdo	9 (~28 %)	7 (22 %)
Classificação em função de cada animal (N=16)		
Redução bilateral de perfusão	Aumento bilateral de perfusão	Resposta mista
6 (~38 %)	2 (~13 %)	8 (50 %)

3.3.2. Grupo de isquémia do membro posterior

3.3.2.1. Comparação de técnicas

No modelo humano as provocações foram consistentemente registadas num membro escolhido aleatoriamente, com o indivíduo em respiração espontânea e sem qualquer sedação ou anestesia (em vigília). Já no modelo animal de isquémia do membro posterior, foi escolhido o membro esquerdo para a intervenção cirúrgica, mantendo o animal em respiração espontânea e sob anestesia⁽²⁶⁷⁾.

A remoção da artéria e veia femorais superficiais provocou uma redução drástica da perfusão, e, portanto, de fornecimento de oxigénio ao membro posterior dos murganhos, como observado pelo decréscimo significativo da amplitude do sinal de LDF registado na tabela 52.

Por forma a testar a eventual concordância dos valores de perfusão obtidos pelas técnicas de LDI e LDF, usou-se o teste de correlação de Spearman. Para esta correlação, foram considerados os valores absolutos de LDF e LDI medidos durante a fase de estabilização de todos os dias de medição. Foi encontrada uma correlação positiva significativa entre os valores absolutos dos dois sinais ($p < 0,01$), com um Rho de 0,68, bem como entre os rácios isquémia/controlo obtidos pelas duas técnicas ($p < 0,01$), com um Rho de 0,64. Este resultado sugere que as alterações de perfusão locais que ocorrem na região central da pata (adjacente às almofadas plantares, onde foi medido o fluxo por LDF), parecem ser representativas das alterações de perfusão regionais que ocorrem em toda a pata e que são medidas pela técnica de LDI. Sugere ainda que o parâmetro rácio isquémia/controlo, frequentemente adotado para expressar os resultados obtidos com a técnica de LDI, parece ser igualmente adequado para a técnica de LDF. Como tal, a técnica de LDF poderá ser considerada uma alternativa adequada à LDI para a monitorização da perfusão do membro inferior, com a vantagem de permitir a exploração dos mecanismos de regulação envolvidos.

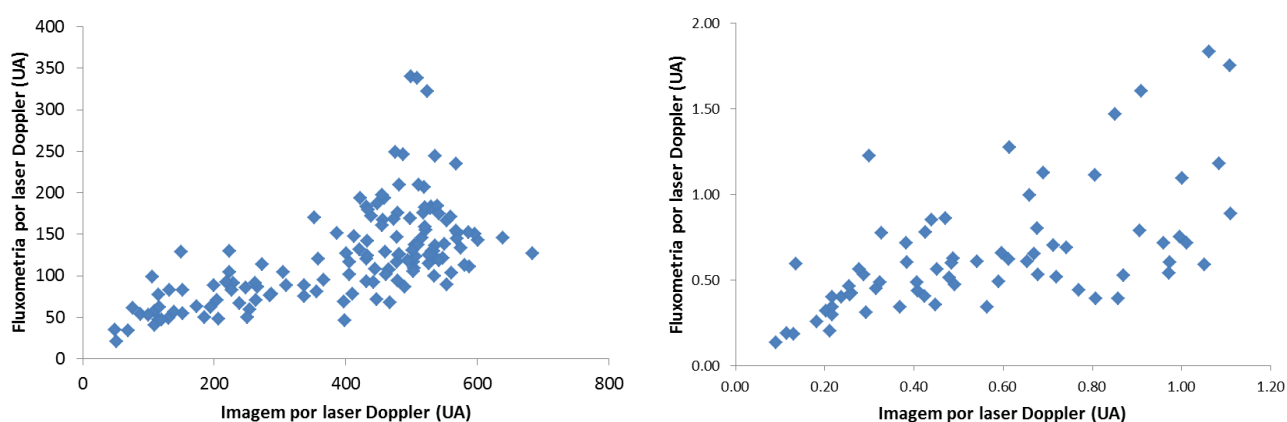


Figura 42. Representação gráfica dos valores absolutos médios de fluxo sanguíneo (à esquerda) e dos rácios isquémia/controlo (à direita), avaliados por LDI e por LDF.

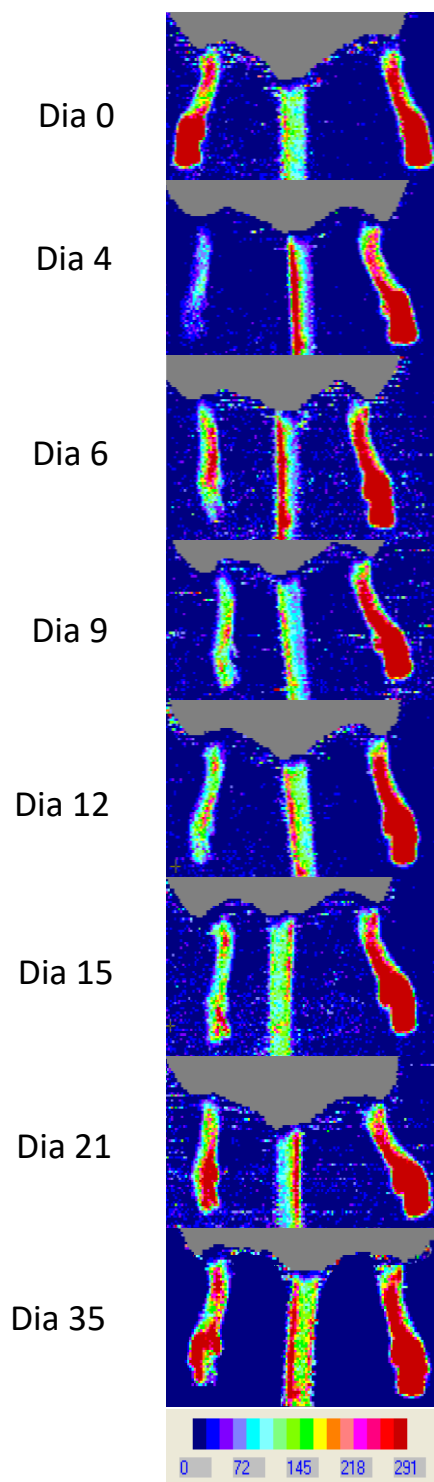


Figura 43. Fluxo sanguíneo das patas controlo (direita) e isquémica (esquerda), medido por LDI, no dia 0 (dia anterior à cirurgia) e nos dias 4, 6, 9, 12, 15, 21 e 35 (em cima). O fluxo sanguíneo é dado pela intensidade cromática e expresso em UA (em baixo).

A isquémia, induzida experimentalmente, provoca um conjunto de respostas compensatórias, nomeadamente a formação de novos vasos (angiogénese), bem como a criação de circulações colaterais (arteriogénese). A resposta angiogénica é largamente iniciada pela libertação do fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor* – VEGF) que induz a sobreexpressão dos recetores. A resposta a esta interação mensageiro-recetor é a libertação de outros fatores a partir do endotélio, como por exemplo, metaloproteinases. Estas enzimas degradam a matriz extracelular, criando espaço para a migração das células endoteliais por forma a criarem novos vasos sanguíneos⁽²⁶⁸⁾.

A tabela 52 e as figuras 43 a 45 mostram a evolução do fluxo sanguíneo nos membros controlo e isquémico ao longo dos 35 dias de seguimento dos animais. No membro sujeito a cirurgia, foram registados valores de fluxo significativamente menores em todos os dias após a cirurgia em relação aos valores basais. Do dia 4 ao dia 9 registou-se um aumento progressivo de fluxo, tendo descido até no dia 12. Deste dia e até ao dia 35 o fluxo aumentou novamente. No dia 35 o valor de fluxo registado foi significativamente menor que o valor basal ($p=0.028$). Estes resultados revelam uma recuperação progressiva da perfusão do membro posterior, apesar de não ser completa. A recuperação da perfusão após indução de isquémia pode ser atribuída aos fenómenos de angiogénese e arteriogénese.

Após a indução cirúrgica da isquémia no membro esquerdo, verificaram-se, no membro controlo, valores de fluxo significativamente mais baixos em todos os dias pós-cirurgia em comparação com os valores basais (pré-cirurgia). Poder-se-ia esperar, *a priori*, o aumento de perfusão pós-cirurgia no membro controlo, por redistribuição de sangue do membro isquémico para este, sobretudo considerando que a hemorragia que ocorreu durante a cirurgia foi mínima. Estes resultados, pelo contrário, sugerem que terá existido, no próprio membro controlo, um processo de redistribuição de sangue, provavelmente para o membro isquémico. A figura 44 ilustra a evolução média do fluxo sanguíneo nos membros controlo e isquémico ao longo do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos diferentes dias de análise. Pode observar-se a diminuição progressiva da diferença de valores de fluxo entre os dois membros, na fase de estabilização, ao longo dos dias de medição. No dia 35, a perfusão atingida nos dois membros é muito semelhante, tal como observado inicialmente no dia 0. Portanto, estes resultados sugerem que ao longo do período de avaliação de 35

dias, os processos de regulação da perfusão terão provocado a recuperação da perfusão do membro isquémico à custa da redução da perfusão do membro normal.

A provocação de oxigénio revelou respostas diferentes nos dois membros ao longo do período de observação, como mostra a figura 44. No membro controlo verificou-se uma redução de perfusão em todos os dias de observação, com exceção do dia 6, no qual se verificou um aumento de perfusão. No membro isquémico, pelo contrário, verificou-se consistentemente um aumento de perfusão como resposta à respiração de oxigénio. Este perfil de resposta do membro isquémico foi já encontrado no humano, em indivíduos com doença arterial periférica (DAP)⁽¹⁵¹⁾, pelo que fica evidenciada a utilidade deste modelo animal como modelo de estudo dos mecanismos da regulação da perfusão na DAP. Estes resultados suportam a noção de que tecidos isquémicos respondem a uma provocação com oxigénio a 100% de uma forma oposta à de um tecido com perfusão normal. Por forma a serem explorados os mecanismos de regulação da perfusão em cada membro ao longo dos vários dias de observação, procedeu-se à análise de componentes do sinal de LDF.

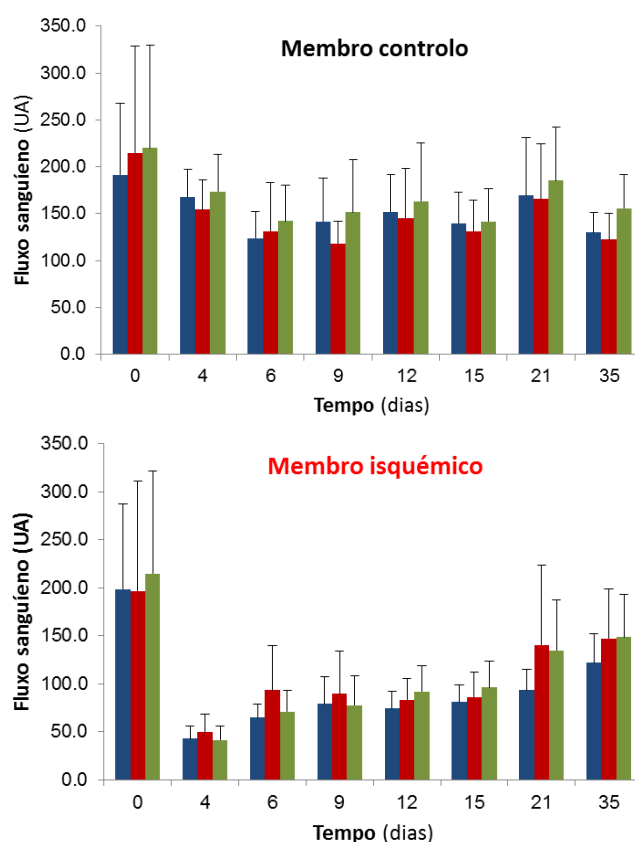


Figura 44. Valores médios (azul – fase estabilização; vermelho – fase provocação; verde – fase recuperação) da amplitude de cada componente do sinal de LDF nos diferentes dias de medição no membro controlo (esquerda) e isquémico (direita).

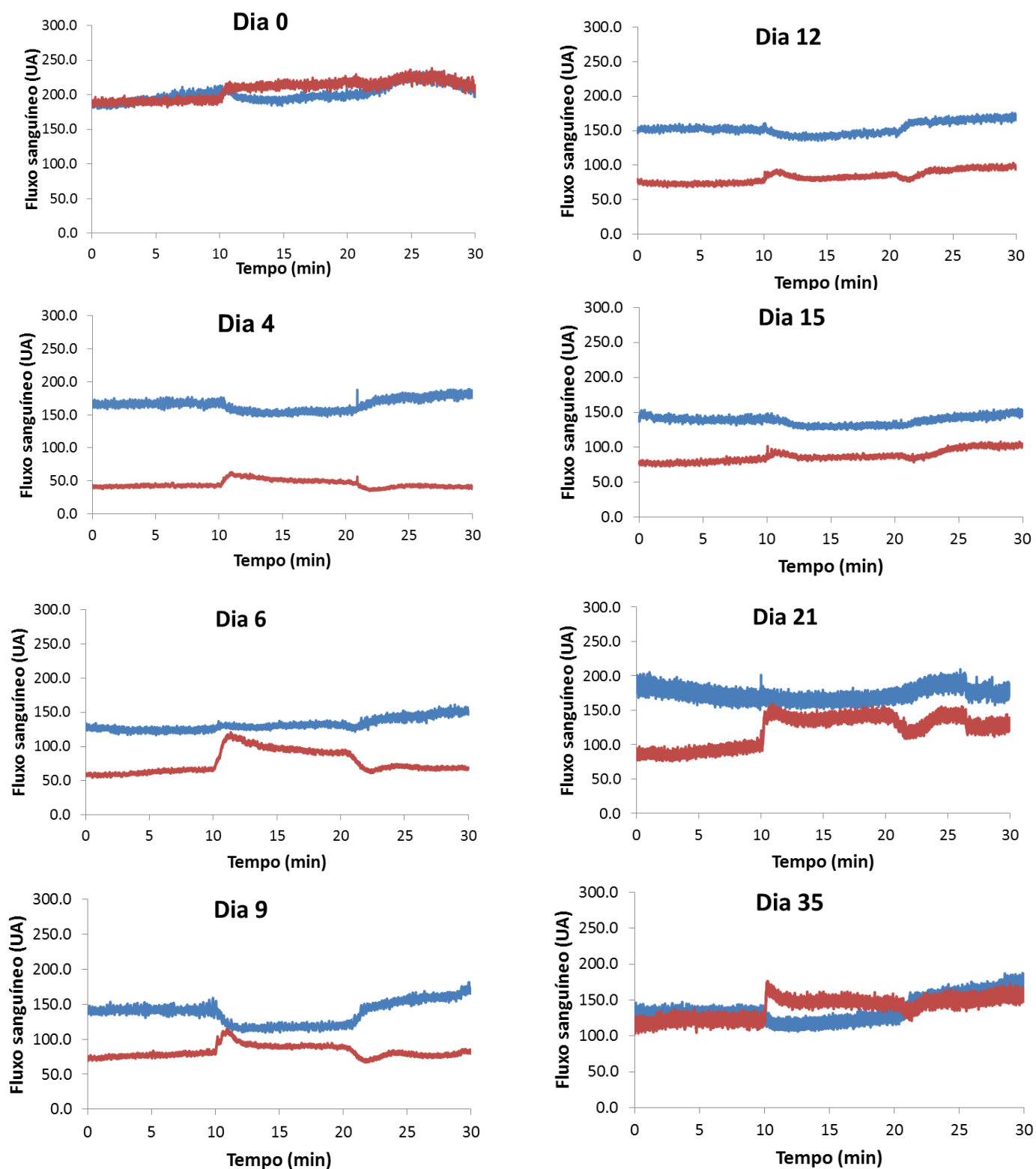


Figura 45. Evolução do fluxo sanguíneo médio nos membros controlo (traçado azul) e isquémico (traçado vermelho) ao longo do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos diferentes dias de análise.

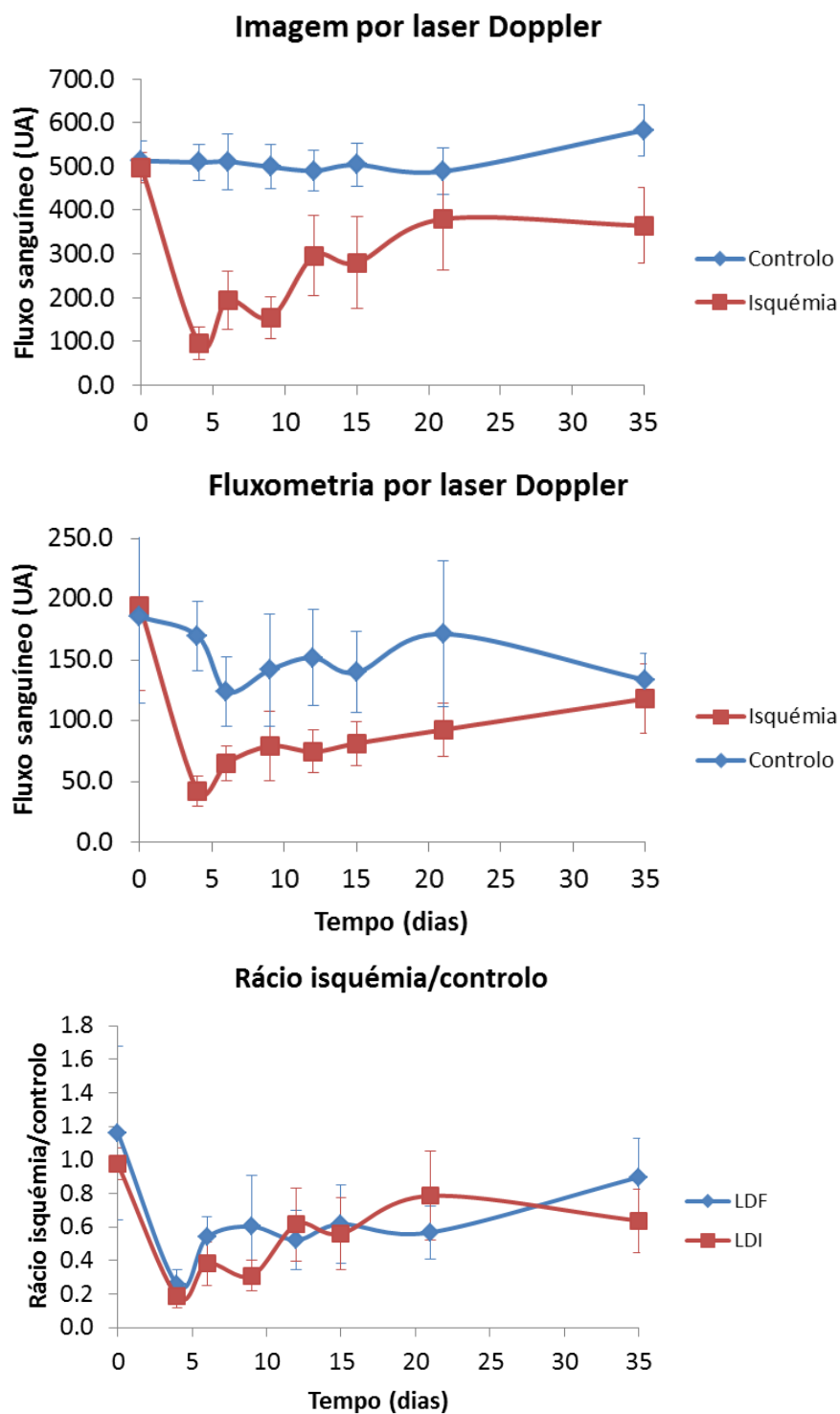


Figura 46. Evolução do fluxo sanguíneo, medido por LDI (em cima), por LDF (ao centro), ao longo do período de acompanhamento dos murganhos. Evolução do rácio do fluxo sanguíneo entre os membros isquémico e controlo por LDI e LDF (em baixo), ao longo do período de acompanhamento dos murganhos.

Tabela 52. Evolução do **fluxo sanguíneo** medido por LDF ao longo do período de acompanhamento. Comparação estatística entre a fase I de cada dia de medição com a fase I do dia 0. Comparação estatística das fases II e III com a fase I em cada dia de medição ($p < 0,05$).

Membro		Dia 0	Dia 4	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 15	Dia 21	Dia 35
Controlo	Fase I	191,4	167,6	123,9	141,6	151,9	139,6	169,6	129,9
	p	-	0,012*	0,008*	0,008*	0,008*	0,008*	0,008*	0,038*
	Fase II	215,1	154,6	131,6	118,1	145,2	130,9	165,7	122,3
	Fase III	207,3	102,7	102,4	110,1	122,3	114,0	148,3	155,7
	p (Fase I vs Fase II)	0,515	0,123	0,011*	0,086	0,013*	0,374	0,008*	0,086
	p (Fase I vs Fase III)	0,038*	0,327	0,374	0,953	0,011*	0,086	0,011*	0,015*
Isquémico	Fase I	198,8	43,0	65,1	79,0	74,4	81,1	93,6	121,9
	p	-	0,008*	0,008*	0,008*	0,008*	0,008*	0,008*	0,028*
	Fase II	196,7	49,7	93,7	89,8	83,3	86,5	140,5	147,3
	Fase III	207,3	102,7	102,4	110,1	122,3	114,0	148,3	148,9
	p (Fase I vs Fase II)	0,515	0,086	0,011*	0,086	0,013*	0,374	0,008*	0,051
	p (Fase I vs Fase III)	0,038*	0,515	0,374	0,767	0,011*	0,086	0,015*	0,011*

Poucos estudos de microcirculação têm sido desenvolvidos com esta técnica e, em qualquer caso, a caracterização espectral dos componentes deste sinal não foi ainda tentada, razão pela qual entendemos aceitar este novo desafio. Para tal, realizámos a decomposição do sinal pela FFT e pela WT. O periodograma de WT revelou 5 bandas principais, sendo que a de maior frequência corresponde a um intervalo de frequências compatível com as atividades cardíaca e respiratória do murganho⁽²⁶⁹⁾.

Colocou-se como hipótese o facto desta banda resultar da coalescência espectral das bandas cardíaca e respiratória individuais. Para determinar as posições efetivas das bandas cardíaca e respiratória foi utilizado o frequenciograma da transformada de Fourier. Comparando o frequenciograma com o periodograma conclui-se que a primeira banda do periodograma resulta da coalescência espectral das duas bandas mencionadas, motivo pelo qual se atribuiu o nome de banda “cardiorrespiratória”. Dado que a transformada de Fourier apresenta uma resolução baixa para fenómenos de baixas frequências, os limites das bandas miogénica, simpática e endoteliais foram analisados a partir do periodograma de ondeleta. De uma maneira geral, os limites superior e inferior das bandas do periodograma

são mais largos que os limites das bandas respetivas quando observadas pelo frequenciograma, devendo-se esta observação ao facto de a transformada de ondeleta não apresentar resolução temporal infinita. Por este motivo, os limites das bandas cardíaca e respiratória foram determinados pelo frequenciograma de Fourier e os restantes pelo periodograma da WT.

3.3.3. *Análise espectral do sinal de LDF de murganhos*

Tabela 53. Limites médios (em Hertz) esquerdo e direito das bandas detetadas no periodograma de ondeleta em ambas as patas dos murganhos, N=16).

Banda	Estabilização		Provocação		Recuperação	
	Limite esquerdo	Limite direito	Limite esquerdo	Limite direito	Limite esquerdo	Limite direito
Pata esquerda						
#1 (Cardíaca)	5,3	4,6	4,7	3,9	5,9	5,1
#2 (Respiratória)	3,8	3,2	2,9	3,4	4,1	3,6
#3 (Miogénica)	0,17	0,059	0,17	0,052	0,18	0,064
#4 (Simpática)	0,052	0,020	0,051	0,024	0,060	0,021
#5 (Endotelial dependente de NO)	0,017	0,0094	0,021	0,0089	0,02	0,0094
#6 (Endotelial independente de NO)	0,0084	0,0042	0,0081	0,0041	0,0084	0,0048
Pata direita						
#1 (Cardíaca)	5,4	4,5	4,7	3,7	6,0	5,2
#2 (Respiratória)	3,9	3,2	3,0	2,2	4,0	3,3
#3 (Miogénica)	0,16	0,061	0,15	0,055	0,17	0,064
#4 (Simpática)	0,056	0,020	0,049	0,019	0,051	0,020
#5 (Endotelial dependente de NO)	0,0196	0,0104	0,020	0,011	0,019	0,009
#6 (Endotelial independente de NO)	0,0092	0,0048	0,009	0,0048	0,009	0,0046

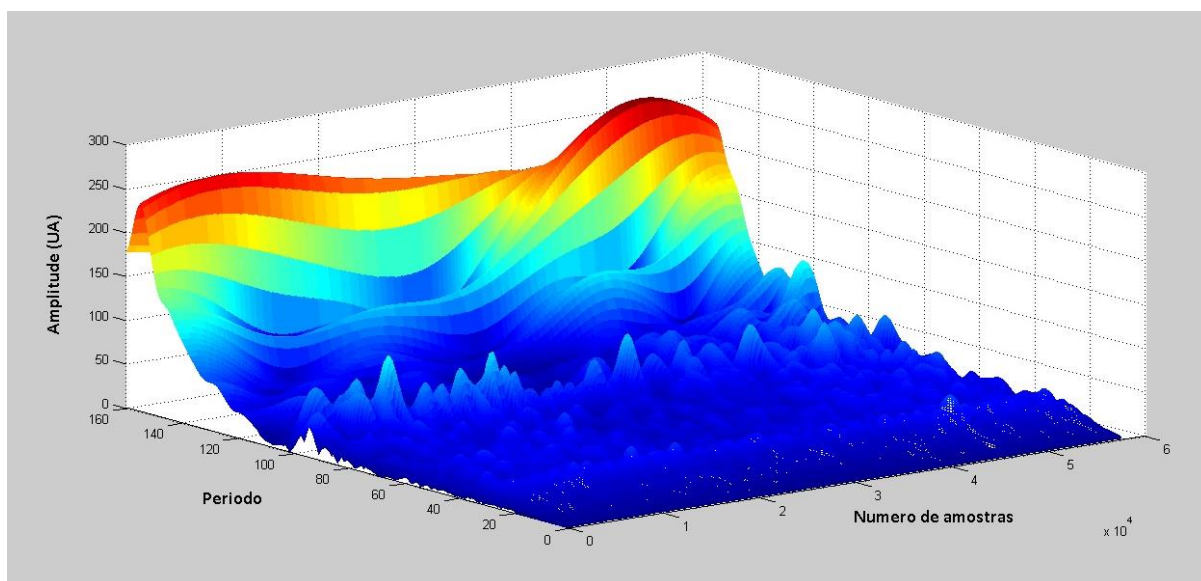


Figura 47. Representação tridimensional da amplitude do sinal de LDF de um murganho ilustrativo (#2, pata esquerda, 27 semanas) ao durante o protocolo de respiração de oxigênio a 100%.

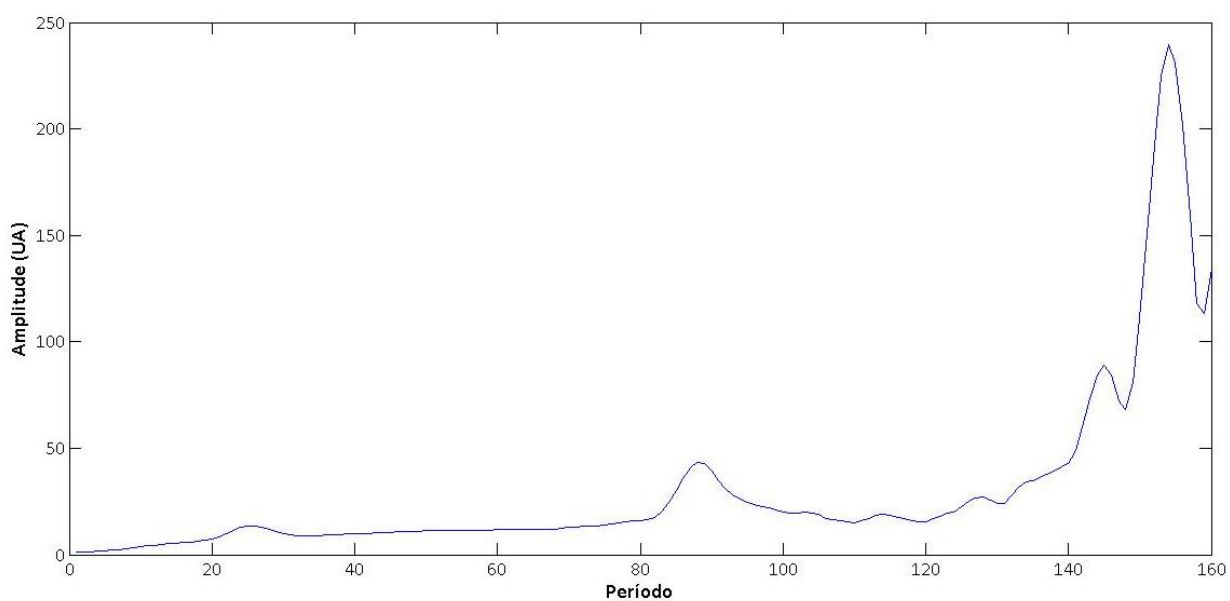


Figura 48. Periodograma do sinal de LDF de um murganho representativo (#2, pata esquerda, 27 semanas) durante o protocolo de respiração de oxigênio a 100%.

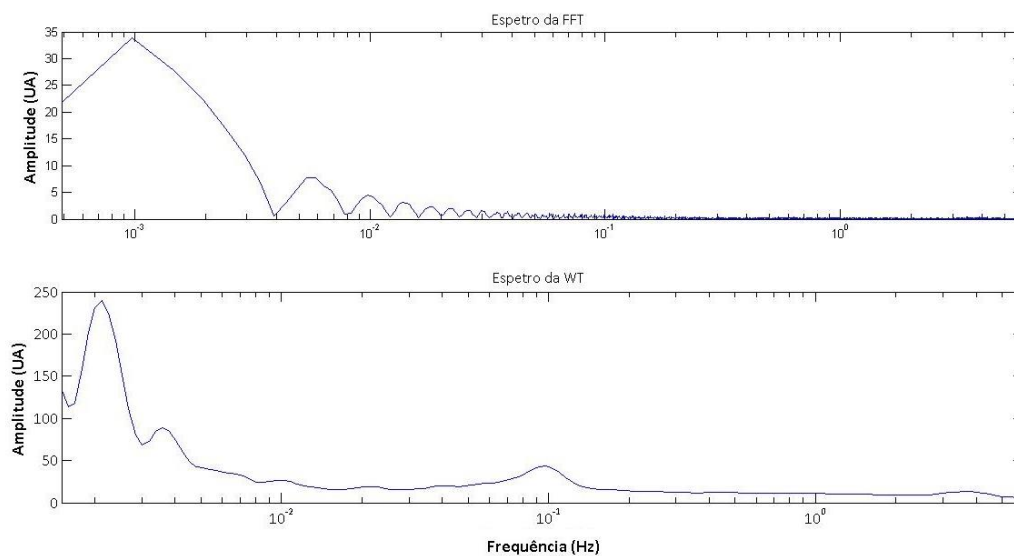


Figura 49. Região 0-7 Hz dos espectros (representação semilogarítmica) do sinal de LDF de um murganho representativo (#2, pata esquerda, 27 semanas) obtidos por FFT (em cima) e por WT (em baixo).

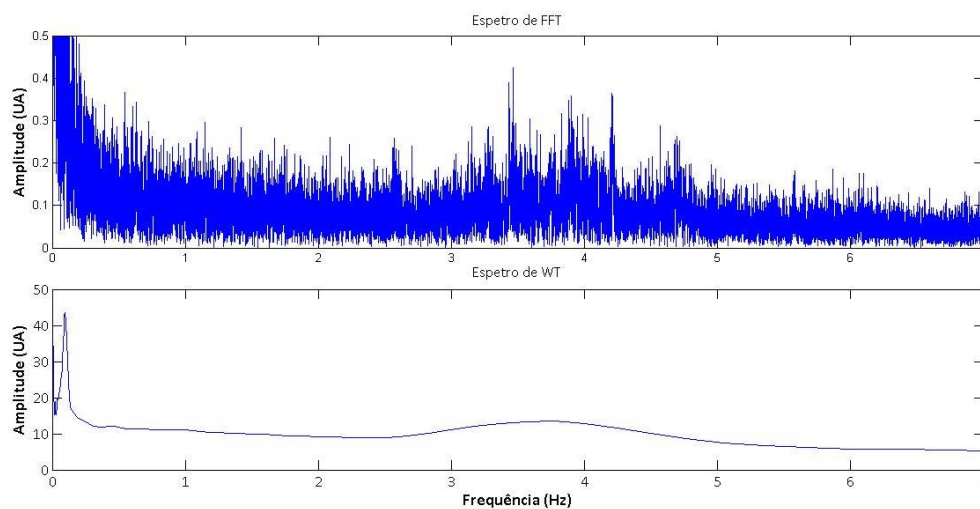


Figura 50. Região 0-7 Hz dos espectros (representação semilogarítmica) do sinal de LDF de um murganho representativo (#2, pata esquerda, 27 semanas) obtidos por FFT (em cima) e por WT (em baixo).

Tabela 54. Limites (em Hertz) das bandas detetadas no frequenciograma de Fourier em ambas as patas dos murganhos, N=16).

Banda	Estabilização		Provocação		Recuperação	
	Limite esquerdo	Limite direito	Limite esquerdo	Limite direito	Limite esquerdo	Limite direito
Pata esquerda						
#1 (Cardíaca)	5,3	4,6	4,7	3,9	5,9	5,1
#2 (Respiratória)	3,8	3,2	2,9	3,4	4,1	3,6
Pata direita						
#1 (Cardíaca)	5,4	4,5	4,7	3,7	6,0	5,2
#2 (Respiratória)	3,9	3,2	3,0	2,2	4,0	3,3

Pelo periodograma da WT, verificam-se existir pequenas diferenças nos limites das bandas nos dois membros, particularmente na banda cardiorrespiratória. No entanto, as bandas cardíaca e respiratória identificadas pela FTT demonstram uma variabilidade muito menor, sugerindo ser mais adequada para a identificação espectral de fenómenos de alta frequência. Consta-se que os intervalos de frequência cardíaca e respiratória dos murganhos diminuíram durante a provocação. A diminuição na frequência da atividade cardíaca pode dever-se ao aprofundamento da anestesia, mas também ao efeito da hiperóxia, estando já descrito o seu efeito cronotrópico negativo em humanos⁽²⁷⁰⁾. Na fase de recuperação, ambas as frequências sofreram um aumento para valores superiores aos da fase de estabilização, o que pode ser novamente explicado pela ausência do efeito hiperóxico, bem como pela diminuição da profundidade anestésica por eliminação dos fármacos. As diferenças nos intervalos de frequência das restantes frequências entre os dois membros na fase de estabilização podem dever-se à variabilidade espacial.

Apresentam-se os limites das seis componentes do sinal de LDF nos dois membros, uma vez que pode ser encontrada variabilidade regional. De facto, faz sentido que assim seja, sobretudo para as componentes de atividade local. As atividades cardíaca, respiratória e simpática não deverão, *a priori*, variar entre os dois membros em termos de frequência, uma vez que se referem a fenómenos cujas influências são detetadas em diferentes pontos de uma árvore vascular microcirculatória, mas em sincronia. Já a atividade miogénica é um

fenómeno local, cuja frequência de atuação depende de certas características (calibre e comprimento) dos vasos sob análise, podendo os seus limites espectrais variar entre membros. Dado que a atividade endotelial faz variar a própria atividade miogénica, é expectável que os próprios limites destas duas bandas também possam diferir entre membros.

3.3.4. Transformada de ondeleta (WT)

3.3.4.1. Grupo controlo

Conhecendo-se os limites das bandas espectrais identificadas e que se propõem corresponder às atividades mencionadas supra, foi-lhe aplicada a WT ao sinal de LDF e determinada a contribuição de cada componente para o sinal total. Para esta análise foram consideradas ambas as patas membros dos murganhos.

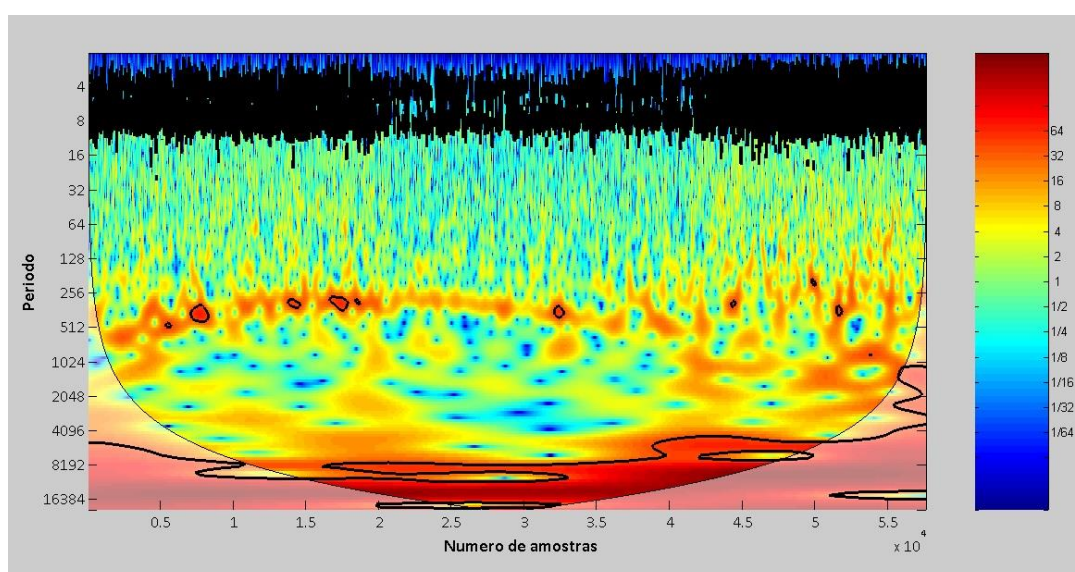


Figura 51. Escalograma do sinal de LDF de um murganho representativo (#2, pata esquerda, 27 semanas) durante o protocolo de respiração de oxigénio a 100%.

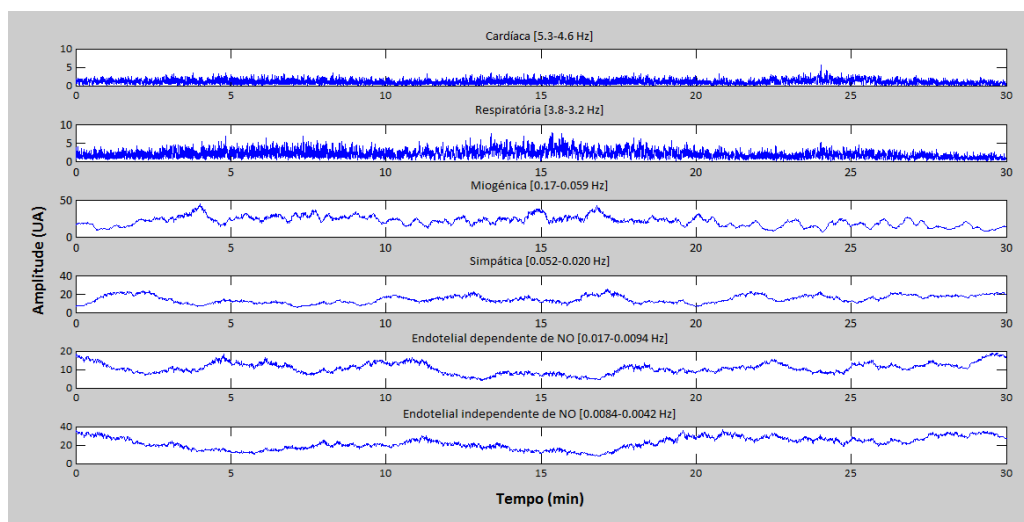


Figura 52. Evolução da amplitude de cada componente do sinal de LDF de um murgancho representativo (#2, pata esquerda, 27 semanas) durante o protocolo de respiração de oxigénio a 100%.

Tabela 55. Média e desvio-padrão (dp) do rácio componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% (N=32).

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Cardíaca	média	1,3	2,1	1,2
	dp	0,5	0,9	0,4
	p	-	<0,001*	0,334
Respiratória	média	2,0	2,7	1,8
	dp	0,9	1,6	0,8
	P	-	0,043*	0,012*
Miogénica	média	20,2	24,0	15,5
	dp	6,9	7,9	4,8
	P	-	0,002*	<0,001*
Simpática	média	13,7	12,9	13,0
	dp	3,8	3,6	2,9
	P	-	0,416	0,443
Endotelial dependente de NO	média	12,7	11,7	13,5
	dp	4,5	6,1	4,4
	p	-	0,030*	0,382
Endotelial independente de NO	média	27,0	24,6	33,7
	dp	10,7	7,6	8,6
	p	-	0,121	0,001*

Considerando todos os animais e ambas as patas em simultâneo, verificou-se o aumento significativo das componentes cardíaca ($p<0,001$), respiratória ($p=0,043$) e miogénica ($0,002$), bem como uma redução significativa da componente endotelial dependente de NO ($p=0,03$). As atividades simpática e endotelial independente de NO também diminuíram, mas sem significância. Estes resultados são semelhantes aos obtidos para o humano, nomeadamente o aumento da contribuição das componentes cardíaca, respiratória e miogénica e redução das contribuições endoteliais. Estes resultados sugerem que a redução de perfusão é induzida pela inibição da produção endotelial de NO, que se sobrepõe ao estímulo dilatador que é o aumento da atividade miogénica. No entanto, há que considerar que a referida análise não distingue os registos nos quais se verifica diminuição da perfusão e aumento da mesma, tratando-se apenas de uma análise das contribuições médias.

Tabela 56. Média e desvio-padrão (dp) das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos membros que responderam com diminuição do sinal de LDF ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Cardíaca	média	1,3	2,1	1,2
	dp	0,4	0,8	0,4
	p	-	$<0,001^*$	0,181
Respiratória	média	2,1	3,2	1,9
	dp	0,8	1,7	0,8
	p	-	$0,011^*$	0,077
Miogénica	média	19,7	23,5	15,0
	dp	6,0	7,7	4,6
	p	-	$0,025^*$	$0,001^*$
Simpática	média	13,4	12,2	12,9
	dp	3,6	2,4	2,6
	p	-	0,161	0,695
Endotelial dependente de NO	média	12,7	10,3	13,3
	dp	4,1	5,0	3,9
	p	-	$0,011^*$	0,573
Endotelial independente de NO	média	26,4	24,2	33,1
	dp	8,1	5,7	8,3
	p	-	0,240	$0,005^*$

Por forma a comprovar os mecanismos responsáveis pelos dois tipos de respostas vasculares à respiração de oxigénio (diminuição de perfusão / vasoconstrição e aumento de perfusão / vasodilatação) os registos de LDF foram analisados separadamente quanto à resposta, cujos resultados se apresentam nas tabelas 56 e 57. Nos membros que responderam com aumento de perfusão, verificaram-se aumentos das atividades cardíaca ($p<0,001$), respiratória ($p=0,011$), e miogénica ($p=0,025$) e uma redução das componentes simpática e de ambas as endoteliais, sendo significativa apenas para a dependente de NO ($p=0,011$). Estes dados sugerem que a redução de perfusão encontrada se deve à redução da produção endotelial de NO atividade, que se sobrepõe ao efeito dilatador do aumento da atividade miogénica.

Tabela 57. Média e desvio-padrão (dp) das componentes do sinal de LDF nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos membros que responderam com aumento do sinal de LDF ($p<0,05$; * - estatisticamente significativo).

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Cardíaca	média	1,3	1,9	1,2
	dp	0,5	0,9	0,5
	p	-	0,012*	0,964
Respiratória	média	1,9	1,8	1,6
	dp	1,1	1,0	0,9
	p	-	0,592	0,081
Miogénica	média	21,0	24,8	16,4
	dp	8,5	8,4	5,2
	p	-	0,025*	0,099
Simpática	média	14,2	14,1 ±	13,1
	dp	4,3	4,9	3,4
	p	-	0,859	0,530
Endotelial dependente de NO	média	12,8	14,1	13,9
	dp	5,4	7,2	5,3
	p	-	0,783	0,477
Endotelial independente de NO	média	27,9	25,3	34,7
	dp	14,3	10,2	9,4
	p	-	0,170	0,136

Nos membros que responderam com aumento de perfusão verificou-se o aumento significativo das atividades cardíaca ($p=0,012$) e miogénica ($p=0,025$). As atividades respiratória, simpática e endotelial independente de NO diminuíram não significativamente.

Verificou-se também um aumento da atividade endotelial dependente de NO, mas sem significância. Estes resultados sugerem que o aumento de perfusão se deve ao aumento da atividade endotelial dependente de NO, apesar de esta não se ter revelado estatisticamente significativa.

3.3.4.2. Grupo de isquémia do membro posterior

Uma vez que as atividades locais (miogénica, simpática e endoteliais) foram as que demonstraram maior contribuição para a regulação de perfusão tanto no modelo humano como no animal, optou-se por fazer uma avaliação das propriedades apenas destas componentes no grupo dos animais sujeitos a isquémia do membro posterior.

No membro isquémico verificaram-se diversas alterações nos rácios dos componentes ao longo dos dias de acompanhamento. Foram encontradas atividades miogénicas significativamente inferiores nos dias 4 ($p=0,012$), 6 ($p=0,008$), 9 ($p=0,008$) e 12 ($p=0,008$) em face às do dia 0 (pré-cirurgia). Esta resposta poderá explicar a redução de perfusão que ocorre durante este período. Nos dias 15, 21 e 35 não foram encontradas diferenças significativas face à pré-cirurgia. Seria expectável que, de acordo com o fenómeno de Bayliss, esta atividade registasse um aumento compensatório no período pós-cirúrgico, por forma a aumentar a perfusão para tentar manter a viabilidade tecidular. O facto de se ter encontrado uma resposta oposta leva a supor a atuação de um mecanismo que terá diminuído a amplitude desta resposta.

A atividade simpática aumentou no dia 4, provavelmente por uma ativação simpática induzida pela eventual perceção dolorosa do animal nos dias após cirurgia. Do dia 4 ao dia 6 a atividade diminuiu, para aumentar novamente do dia 6 ao dia 15, atingindo neste último dia uma diferença significativa face ao valor pré-cirurgia ($p=0,015$). Do dia 15 ao dia 35 a atividade simpática diminuiu novamente.

A atividade endotelial dependente de NO não sofreu variações significativas ao longo dos dias de avaliação face ao dia pré-cirurgia. Seria de esperar uma redução desta atividade no período pós-cirúrgico, explicada pela redução de perfusão do membro isquémico e, como tal, pela redução da tensão de cisalhamento. A ausência de alteração na atividade desta componente faz supor, mais uma vez, que esta atividade estará sob influência de um

outro sistema de regulação da perfusão. Já a atividade endotelial independente de NO sofreu variações significativas ao longo dos dias de avaliação. Aumentou progressivamente do dia 0 até ao dia 9, e desse dia até ao dia 15. Do dia 15 ao 35 a atividade voltou a aumentar. As diferenças significativas face ao dia 0 foram encontradas nos dias 6 ($p=0,008$) e 35 ($p=0,021$).

Estes resultados sugerem que o processo de recuperação de perfusão do membro posterior é mediado pela produção de vasodilatadores endoteliais que não o NO, cujo efeito dilatador compete com o efeito constritor do sistema nervoso simpático e da redução da atividade miogénica. Esta atividade diminui nos dias 9, 12 e 15, nos quais se verifica uma tendência de aumento da atividade miogénica que, apesar de não voltar a atingir os valores pré-cirurgia, se mantém em valores relativamente estáveis até ao último dia de medição. Nos dias 21 e 35 a contribuição endotelial independente de NO volta a aumentar e a miogénica a diminuir. Estes resultados sugerem, mais uma vez, uma relação inversa entre as atividades miogénica e endoteliais.

Quanto às respostas à provocação com oxigénio ao longo dos vários dias de acompanhamento, verificou-se um aumento constante de perfusão no membro isquémico. Pela análise de componentes verifica-se que a única cuja atividade aumentou de forma mais consistente, podendo explicar de forma mais consistente o aumento de perfusão/vasodilatação, foi a endotelial dependente de NO, que aumentou em todos os dias de medição, com exceção do dia 35. A atividade simpática aumentou em todos os dias exceto nos 9, 12 e 15, enquanto que a miogénica aumentou em todos exceto nos 9 e 12, e a endotelial independente de NO diminuiu em todos os dias, exceto nos dias 9 e 12. Verifica-se, então, que os dias 9, 12 e 15 foram dias “atípicos” quanto às respostas à respiração de oxigénio. Esta “atipicidade” pode estar relacionada com o processo de revascularização em curso, que se sabe ser complexo e heterogéneo em termos temporais.

Tabela 58. Evolução dos rácios médio (+ desvio-padrão) das componentes miogénica, simpática e endoteliais do sinal de LDF do membro isquémico ao longo dos vários dias de observação.

Componente		Dia 0	Dia 4	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 15	Dia 21	Dia 35
Miogénica	Fase I	29,1	11,1	10,5	15,7	22,0	22,0	18,6	20,0
	p	-	0,012*	0,008*	0,008*	0,008*	0,173	0,214	0,110
	Fase II	34,1	15,5	17,2	14,8	19,0	23,7	24,5	29,0
	Fase III	23,1	13,7	11,7	11,0	14,0	17,5	18,0	19,2
	p (Fase I vs Fase II)	0,028*	0,025*	0,008*	0,594	0,086	0,327	0,086	0,038*
	p (Fase I vs Fase III)	0,066	0,208	0,173	0,139	0,008*	0,066	0,767	0,767
Simpática	Fase I	13,8	22,4	12,1	13,2	18,8	24,1	15,0	13,4
	p	-	0,327	0,374	0,767	0,066	0,015*	0,513	0,260
	Fase II	14,9	24,1	13,1	13,1	16,9	23,2	18,3	16,0
	Fase III	20,3	28,4	17,6	16,2	18,4	25,7	19,3	18,0
	p (Fase I vs Fase II)	0,374	0,674	0,286	0,953	0,314	0,953	0,015*	0,173
	p (Fase I vs Fase III)	0,011*	0,036*	0,011*	0,214	0,767	0,594	0,123	0,051
Endotelial dependente de NO	Fase I	15,5	15,7	15,2	15,8	14,4	14,0	16,5	16,3
	p	-	1,000	0,767	0,953	0,110	0,594	0,441	0,441
	Fase II	19,2	17,9	19,5	18,3	17,0	18,9	17,4	14,9
	Fase III	21,8	20,7	23,8	22,3	22,1	21,1	21,6	20,9
	p (Fase I vs Fase II)	0,038*	0,263	0,028*	0,374	0,066	0,066	0,441	0,262
	p (Fase I vs Fase III)	0,008*	0,012*	0,021*	0,008*	0,008*	0,008*	0,051	0,028*
Endotelial independente de NO	Fase I	36,9	46,1	57,3	49,0	36,9	33,8	44,3	44,9
	p	-	0,123	0,008*	0,110	0,953	0,484	0,314	0,021*
	Fase II	31,9	41,8	50,4	54,2	47,5	34,7	40,3	40,7
	Fase III	34,9	37,8	47,3	50,7	45,4	35,6	40,9	41,7
	p (Fase I vs Fase II)	0,028*	0,263	0,066	0,214	0,066	0,779	0,214	0,477
	p (Fase I vs Fase III)	0,314	0,025*	0,021*	1,000	0,066	0,594	0,260	0,441

O comportamento dos componentes do sinal de LDF no membro controlo foi marcadamente diferente do encontrado no membro isquémico. A atividade miogénica aumentou consistentemente nos dias pós-cirurgia face ao dia pré-cirurgia, tendo sido encontradas diferenças significativas nos dias 9 ($p=0,011$), 15 ($p=0,015$) e 35 ($p=0,015$). O comportamento desta atividade não apresentou nenhuma tendência, verificando-se uma oscilação nos seus valores ao longo dos diferentes dias de medição.

A atividade simpática foi a que mais se alterou no decurso do período de avaliação. Verificou-se um aumento no dia 4, o que pode ser explicado mais uma vez pelas condições de elevado stress pós-cirúrgico do animal. Do dia 4 ao dia 12, inclusive, esta atividade diminuiu até ao dia 15, voltando a diminuir até ao dia 35. Os valores registados ao longo do período de acompanhamento não foram significativamente diferentes face aos do dia 0.

A atividade endotelial dependente de NO manteve-se consistentemente abaixo do valor pré-cirurgia. Apresentou um comportamento irregular até ao dia 15 – diminuiu no dia 4, aumentou no dia 6, diminuiu novamente no 9 e aumentou novamente no dia 12. Do dia 12 até ao dia 35 voltou a diminuir. A atividade endotelial independente de NO também se manteve consistentemente reduzida face ao valor pré-cirurgia. Apresentou, tal como a dependente de NO, um comportamento irregular e oscilatório. A evolução da atividade miogénica foi consistentemente inversa à da atividade endotelial independente de NO, sugerindo uma vez mais um controlo simultâneo destas atividades.

Quanto às respostas à sobressaturação de oxigénio, verificou-se uma inversão na resposta miogénica em todos os dias pós-cirurgia, face ao verificado no grupo de animais controlo – no dia pré-cirurgia a atividade aumentou, mas diminuiu em todos os dias do período pós-cirurgia. A atividade simpática aumentou durante a provocação no dia pré-cirurgia, diminuindo durante a mesma fase nos dias 4 e 6. Do dia 9 até ao 35 voltou a verificar-se novamente um aumento na sua atividade, como no momento pré-cirurgia. A resposta endotelial dependente de NO pré-cirurgia foi de diminuição no dia 0 ($p=0,008$), aumentando no dia 4 e em todos os dias até ao 35. A atividade endotelial independente de NO foi a única com um perfil irregular de resposta – a atividade diminuiu nos dias 0 ($p=0,021$), 12 e 21, e aumentou em todos os restantes.

Estes resultados sugerem que a redução de perfusão que ocorre no membro não intervencionado se deve igualmente à redução da produção de vasodilatadores endoteliais independentes de NO.

Tabela 59. Evolução dos rácios médio (+ desvio-padrão) das componentes miogénica, simpática e endoteliais do sinal de LDF do membro controlo ao longo dos vários dias de observação.

Componente		Dia 0	Dia 4	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 15	Dia 21	Dia 35
Miogénica	Fase I	26,5	40,4	35,2	48,4	29,9	39,6	35,2	42,7
	p	-	0,139	0,086	0,011*	0,594	0,015*	0,314	0,015*
	Fase II	36,6	31,3	33,0	37,5	28,3	31,3	34,4	38,2
	Fase III	27,7	22,4	23,9	25,5	18,6	23,5	24,8	22,7
	P (Fase I vs Fase II)	0,028*	0,050*	0,314	0,038*	0,515	0,051	0,953	0,093
Simpática	P (Fase I vs Fase III)	0,859	0,012*	0,015*	0,008*	0,038*	0,008*	0,066	0,008*
	Fase I	16,5	24,2	18,9	16,8	16,7	23,0	18,8	14,7
	p	-	0,263	0,374	0,767	0,859	0,008*	0,109	0,260
	Fase II	20,1	23,8	16,4	17,8	18,8	27,0	19,7	16,4
	Fase III	22,6	24,0	16,9	17,2	16,8	20,9	17,4	13,8
Endotelial dependente de NO	P (Fase I vs Fase II)	0,260	0,575	0,155	0,594	0,066	0,260	0,953	0,374
	P (Fase I vs Fase III)	0,011*	0,674	0,594	0,477	0,859	0,441	0,477	0,678
	Fase I	19,3	15,8	18,9	13,6	23,3	15,8	15,9	15,7
	p	-	0,161	1,000	0,050	0,441	0,051	0,123	0,038*
	Fase II	15,4	16,3	15,1	13,5	19,4	15,7	15,9	12,7
Endotelial independente de NO	Fase III	12,0	15,8	12,1	12,3	13,3	14,4	12,7	11,1
	P (Fase I vs Fase II)	0,008*	0,889	0,110	0,859	0,173	0,906	0,953	0,075
	P (Fase I vs Fase III)	0,008*	1,000	0,015*	0,374	0,008*	0,260	0,066	0,008*
	Fase I	42,2	24,0	31,1	24,8	35,4	25,8	34,2	30,4
	p	-	0,025*	0,051	0,008*	0,139	0,008*	0,314	0,038*
Endotelial independente de NO	Fase II	28,2	28,8	36,2	31,1	33,8	26,0	29,9	33,5
	Fase III	40,4	40,5	48,9	47,0	53,1	43,5	47,3	54,1
	P (Fase I vs Fase II)	0,021*	0,069	0,066	0,173	0,441	0,722	0,515	0,314
	P (Fase I vs Fase III)	0,953	0,012*	0,008*	0,008*	0,008*	0,011*	0,038*	0,008*

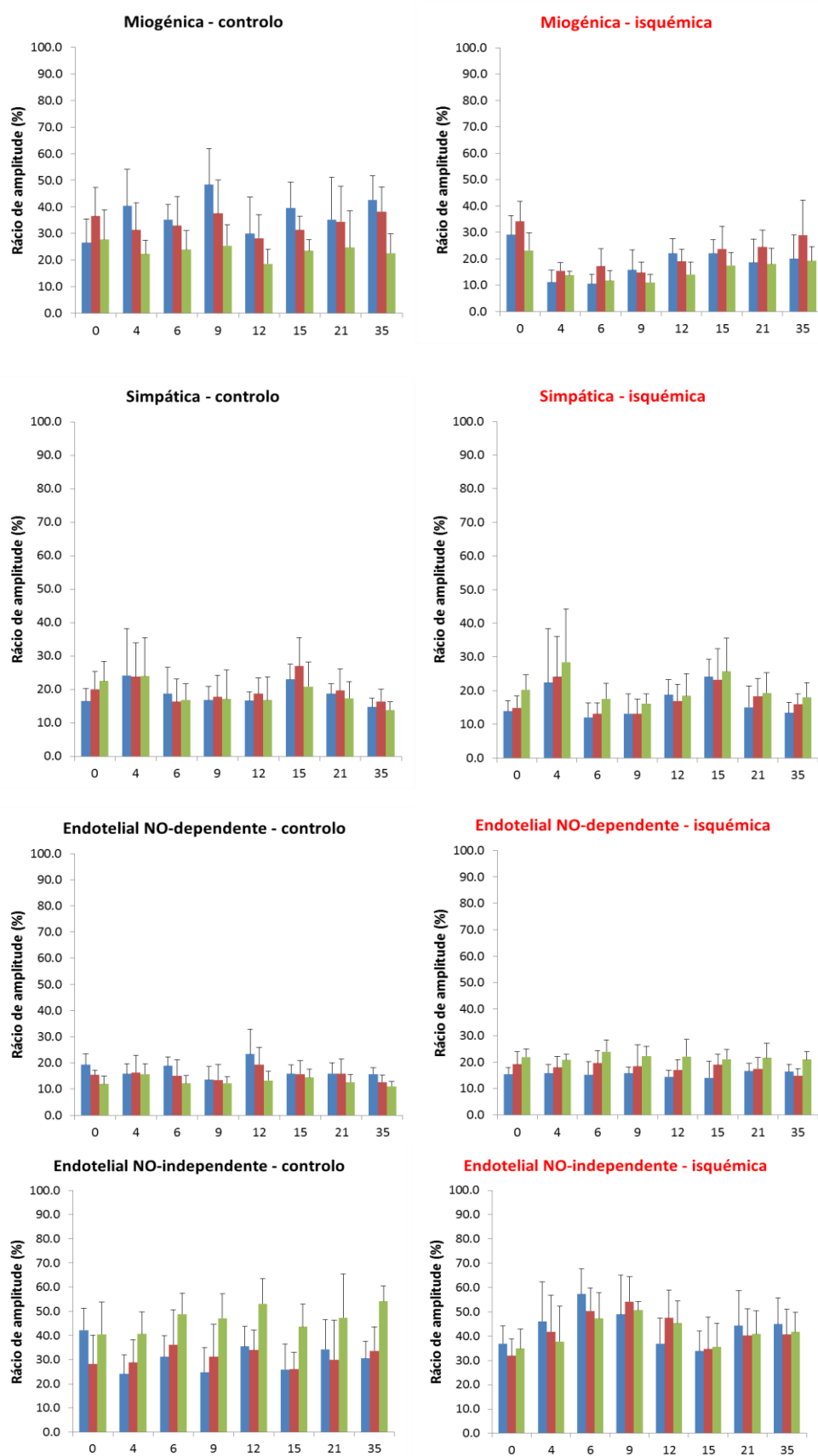


Figura 53. Evolução do rácio de amplitude da WT das componentes miogénica, simpática, endotelial dependente de NO e endotelial independente de NO nas fases de estabilização (azul), provocação (vermelho) e recuperação (verde).

3.3.5. *Análise de Flutuação Retificada*

3.3.5.1. Grupo controlo

Tal como o sinal de LDF dos humanos, também o dos murganhos apresenta propriedades fractais, com valores de expoentes alfa característicos para as suas diferentes componentes. O sinal de LDF não processado apresentou na fase de estabilização um valor de 0,70, valor este que traduz autocorrelações positivas de longo alcance ($\alpha > 0,5$). Este comportamento fractal não se alterou significativamente durante a fase de estabilização, mas aumentou significativamente na fase de recuperação ($p = 0,014$). Tal alteração na fractalidade na fase de recuperação pode dever-se à diminuição do efeito anestésico. Já a ausência de alteração da estabilização para a provocação pode dever-se, por um lado, à manutenção da profundidade anestésica, mas também ao facto de se estar a proceder a uma análise média, podendo as análises agrupadas revelarem outras diferenças. De facto, a análise de DFA em sinais de eletroencefalografia em humanos mostrou que o valor do expoente alfa se altera de acordo com o grau de profundidade anestésica⁽²⁷¹⁾.

O expoente alfa apresentou valores muito próximos para as componentes cardíaca e respiratória e também superiores a 0,5, traduzindo autocorrelações positivas. O expoente alfa das restantes componentes apresentou valores próximos de 1,5, traduzindo fenómenos com um comportamento semelhante ao Browniano. O expoente de todas as componentes sofreu diminuição, que revelou ser significativa apenas para a componente endotelial dependente de NO. Na fase de recuperação o expoente alfa diminuiu para as componentes miogénica e endotelial independente de NO, mas aumentou para as restantes, aumento este que foi significativo para as componentes cardíaca e endotelial dependente de NO.

Tabela 60. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigênio a 100% (N=32).

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Sinal de LDF	média ± dp	0,70 ± 0,30	0,71 ± 0,25	0,83 ± 0,25
	p	-	0,108	0,014*
Cardíaca	média ± dp	0,86 ± 0,16	0,80 ± 0,14	0,97 ± 0,15
	p	-	0,055	0,011*
Respiratória	média ± dp	0,87 ± 0,13	0,83 ± 0,08	0,89 ± 0,13
	p	-	0,193	0,389
Miogénica	média ± dp	1,36 ± 0,12	1,34 ± 0,12	1,33 ± 0,13
	p	-	0,537	0,340
Simpática	média ± dp	1,50 ± 0,15	1,49 ± 0,16	1,51 ± 0,12
	p	-	0,984	0,694
Endotelial dependente de NO	média ± dp	1,56 ± 0,15	1,43 ± 0,15	1,65 ± 0,14
	p	-	0,003*	0,010*
Endotelial independente de NO	média ± dp	1,45 ± 0,13	1,39 ± 0,15	1,41 ± 0,14
	p	-	0,108	0,190

Dentro do conjunto dos membros cuja perfusão diminuiu com a provocação, o expoente alfa do sinal de LDF apresentou, na fase de estabilização, um valor de 0,65, tendo sofrido uma diminuição não significativa durante a provocação. Na fase de recuperação o valor de alfa aumentou significativamente face à estabilização ($p=0,017$). Os expoentes alfa das componentes cardíaca e respiratória foram muito próximos, encontrando-se entre 0,5 e 1. Os expoentes das restantes componentes apresentaram valores mais próximos de 1,5. Todos os expoentes diminuíram durante a provocação, mas apenas de forma significativa para a componente endotelial dependente de NO ($p=0,006$).

Durante a fase de recuperação, todos os expoentes aumentaram para valores próximos dos da fase de estabilização, exceto os da componente miogénica, que continuaram a diminuir. As componentes cardíaca e endotelial dependente de NO apresentaram, nesta fase, expoentes significativamente superiores aos da fase de estabilização.

Quanto aos membros que responderam com aumento da perfusão, os resultados observados apresentaram diferenças face aos anteriores. Neste caso, o expoente alfa do sinal de LDF sofreu um aumento não significativo, tendo o mesmo se verificou para a componente simpática. Os expoentes das restantes componentes sofreram diminuições não significativas. A análise de DFA mostrou-se, portanto, útil para distinguir diferentes registos de LDF com base no seu comportamento fractal.

Tabela 61. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos membros que responderam com diminuição do sinal de LDF (N=16, ambos os membros).

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Sinal de LDF	média ± dp	0,65 ± 0,34	0,61 ± 0,20	0,78 ± 0,24
	p	-	0,179	0,016*
Cardíaca	média ± dp	0,86 ± 0,15	0,78 ± 0,13	0,99 ± 0,10
	p	-	0,056	0,017*
Respiratória	média ± dp	0,88 ± 0,12	0,83 ± 0,07	0,88 ± 0,08
	p	-	0,218	0,881
Miogénica	média ± dp	1,36 ± 0,13	1,33 ± 0,11	1,32 ± 0,12
	p	-	0,955	0,641
Simpática	média ± dp	1,54 ± 0,15	1,47 ± 0,17	1,52 ± 0,13
	p	-	0,171	0,654
Endotelial dependente de NO	média ± dp	1,58 ± 0,11	1,45 ± 0,16	1,63 ± 0,14
	p	-	0,006*	0,035*
Endotelial independente de NO	média ± dp	1,46 ± 0,11	1,39 ± 0,13	1,40 ± 0,13
	p	-	0,198	0,197

Tabela 62. Média e desvio-padrão (dp) do expoente alfa do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigênio a 100% nos membros que responderam com aumento do sinal de LDF (N=16, ambos os membros).

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Sinal de LDF	média ± dp	0,79 ± 0,20	0,90 ± 0,22	0,91 ± 0,25
	p	-	0,583	0,388
Cardíaca	média ± dp	0,87 ± 0,18	0,83 ± 0,16	0,94 ± 0,20
	p	-	0,638	0,308
Respiratória	média ± dp	0,86 ± 0,15	0,84 ± 0,09	0,90 ± 0,19
	p	-	0,969	0,209
Miogénica	média ± dp	1,35 ± 0,11	1,35 ± 0,14	1,34 ± 0,15
	p	-	0,433	0,367
Simpática	média ± dp	1,44 ± 0,13	1,54 ± 0,14	1,50 ± 0,09
	p	-	0,170	0,875
Endotelial dependente de NO	média ± dp	1,52 ± 0,20	1,40 ± 0,13	1,67 ± 0,14
	p	-	0,182	0,147
Endotelial independente de NO	média ± dp	1,43 ± 0,17	1,39 ± 0,18	1,42 ± 0,15
	p	-	0,388	0,637

A DFA revelou diferentes alterações no valor dos expoentes alfa dos membros que responderam com diminuição e com aumento de perfusão. Nos membros que responderam com diminuição, verificou-se a diminuição do expoente alfa do sinal de LDF e de todas as componentes. No caso dos membros que responderam com aumento, verificou-se o aumento do expoente alfa do sinal de LDF e da sua componente simpática, a inalteração do expoente da componente miogénica e a diminuição dos expoentes das restantes componentes.

3.3.5.2. Grupo de isquémia do membro posterior

No que toca ao membro isquémico, o elemento comum à evolução do expoente alfa foi o seu aumento do dia 0 para o 4 para todas as componentes. Este aumento revela uma tendência para a adoção de um comportamento mais próximo do Browniano, no caso da componente miogénica, e para a adoção de um comportamento com correlações de longo alcance, no caso das restantes componentes. O expoente alfa da componente miogénica basal alterou-se ao longo do período de avaliação, mas de um modo não significativo.

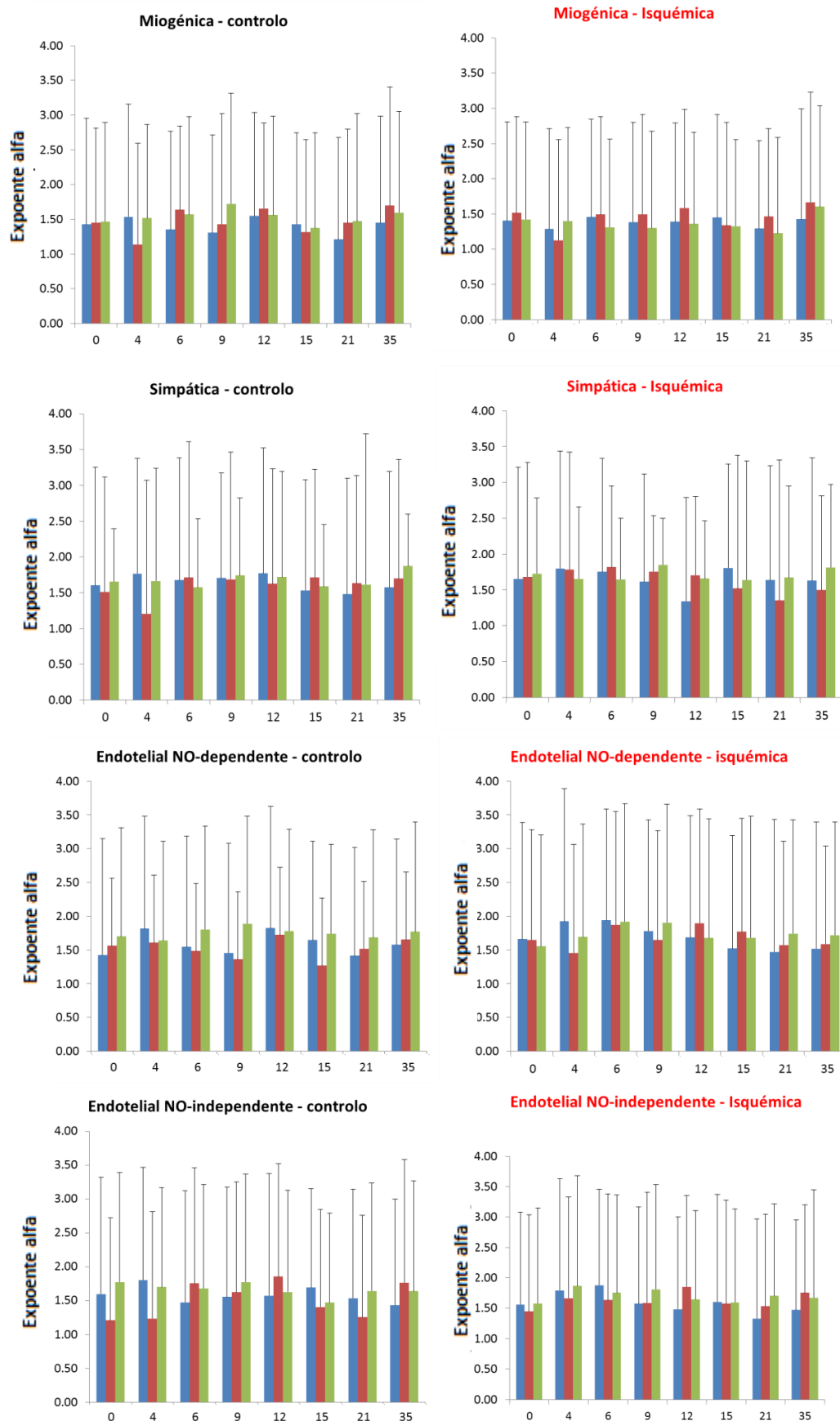


Figura 54. Evolução do expoente alfa das componentes miogénica, simpática, endotelial dependente de NO e endotelial independente de NO nas fases de estabilização (azul), provocação (vermelho) e recuperação (verde).

Atingiu o valor mínimo no dia 21 (1,25) e o máximo no dia 35 (1,56). A provocação não alterou significativamente este valor em nenhum dos dias. Apesar disso é de destacar o perfil de alteração com a provocação ao longo dos dias – nos dias 0 e 4 o valor diminuiu, do 6 ao 21 aumentou com a provocação, no dia 35 diminuiu novamente. Para a componente simpática, o expoente alfa aumentou do dia 0 para 0 4, tendo reduzido até ao dia 12, aumentou de novo no dia 15, reduziu no 21 e aumentou no 35. A provocação diminuiu o valor do expoente no dia 0, aumentando-o dos dias 4 a 12. Voltou a diminuir no dia 15, aumentou no dia 21 e diminuiu no dia 35. O expoente alfa da componente endotelial dependente de NO diminuiu consistentemente ao longo dos dias, exceto nos dias 6 e 15. O expoente da componente endotelial independente de NO diminuiu consistentemente em todos os dias, exceto nos dias 0, 6 e 9. Ambas sofreram aumentos significativos no dia 4 ($p=0,050$ e $p=0,012$).

Quanto ao membro controlo, o expoente alfa da sua componente miogénica oscilou à volta do valor do dia 0, nos vários dias de medição, tendo sido encontrada uma diferença significativa apenas no dia 9 ($p=0,028$). Sofreu um aumento inicial no dia 4 face ao dia 0, mas desceu ao longo dos restantes dias. O seu valor aumentou durante a provocação na maior parte dos dias de medição, à exceção dos dias 9, 15 e 35 em que diminuiu. O expoente da componente simpática sofreu uma diminuição inicial no dia 4, oscilando nos restantes dias acima e abaixo do valor do dia 0. Foi encontrada também uma diferença significativa no dia 9 face ao dia 0 ($p=0,038$). A resposta à provocação não foi uniforme, registando-se um aumento do expoente nos dias 4, 6, 9 e 35 e uma diminuição nos restantes. O expoente da componente endotelial dependente de NO sofreu uma diminuição no dia 4, permanecendo nos restantes dias valores reduzidos face ao dia 0. O expoente aumentou nos dias 0 e 4 em resposta à provocação, passando a partir do dia 6 a diminuir nos valores. Quanto à componente endotelial independente de NO verificou-se igualmente uma redução no expoente alfa no dia 4 face ao dia 0, redução essa que se manteve ao longo de todos os dias de medição. Foram encontradas diferenças significativas nos dias 9, 15 e 35 face ao dia 0. A resposta dominante à provocação foi uma redução no expoente alfa, registando-se um aumento apenas nos dias 6, 9 e 35.

Tabela 63. Expoente alfa das componentes miogénica, simpática, endotelial dependente de NO e endotelial independente de NO para o membro isquémico nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos diferentes dias de análise ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Componente		Dia 0	Dia 4	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 15	Dia 21	Dia 35
Miogénica	Fase I	1,40	1,43	1,39	1,41	1,40	1,46	1,25	1,56
	p	-	0,176	0,859	0,374	0,766	0,575	0,953	0,033*
	Fase II	1,37	1,30	1,42	1,46	1,57	1,51	1,31	1,22
	Fase III	1,39	1,32	1,25	1,37	1,29	1,23	1,36	1,44
	p (Fase I vs Fase II)	0,594	0,292	1,000	0,767	0,594	0,398	0,678	0,139
Simpática	p (Fase I vs Fase III)	0,859	1,000	0,173	0,173	0,033*	0,373	0,767	0,086
	Fase I	1,55	1,64	1,59	1,50	1,45	1,81	1,60	1,71
	p	-	0,091	0,050*	0,314	0,767	0,259	0,286	0,327
	Fase II	1,54	1,65	1,71	1,80	1,75	1,52	1,66	1,61
	Fase III	1,64	1,83	1,68	1,69	1,68	1,60	1,57	1,72
Endotelial dependente de NO	p (Fase I vs Fase II)	0,812	0,021*	0,673	0,051	0,906	0,373	0,123	0,593
	p (Fase I vs Fase III)	0,063	0,944	0,259	0,401	0,314	0,593	0,440	0,314
	Fase I	1,73	1,97	1,65	1,65	1,81	1,68	1,96	1,88
	p	-	0,050*	0,086	0,173	0,373	0,594	0,953	0,213
	Fase II	1,63	1,61	1,68	1,62	1,69	1,68	1,54	1,45
Endotelial independente de NO	Fase III	1,65	1,68	1,74	1,76	1,77	1,80	1,69	1,67
	p (Fase I vs Fase II)	0,086	0,012*	0,051	0,407	0,477	0,183	0,260	0,109
	p (Fase I vs Fase III)	0,021*	0,093	0,028*	0,594	0,944	0,678	0,553	0,441
	Fase I	1,52	1,84	1,58	1,59	1,52	1,77	1,64	1,48
	p	-	0,012*	0,038*	0,050	0,260	0,635	0,110	0,038*
Endotelial independente de NO	Fase II	1,59	1,66	1,75	1,82	1,50	1,70	1,51	1,44
	Fase III	1,57	1,81	1,61	1,72	1,46	1,53	1,51	1,78
	p (Fase I vs Fase II)	0,342	0,036*	0,342	0,154	0,953	0,123	0,236	0,086
	p (Fase I vs Fase III)	0,259	0,888	0,678	0,314	0,859	0,326	0,813	0,441

Tabela 64. Expoente alfa das componentes miogénica, simpática, endotelial dependente de NO e endotelial independente de NO para o membro controlo nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos diferentes dias de análise ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Componente		Dia 0	Dia 4	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 15	Dia 21	Dia 35
Miogénica	Fase I	1,53	1,63	1,42	1,40	1,49	1,31	1,47	1,54
	p	-	0,726	0,214	0,028*	0,263	0,859	0,767	0,374
	Fase II	1,36	1,46	1,20	1,59	1,23	1,33	1,35	1,71
	Fase III	1,42	1,35	1,41	1,59	1,42	1,37	1,55	1,46
	p (Fase I vs Fase II)	0,050	0,018*	0,767	0,343	0,213	0,086	0,260	0,722
Simpática	p (Fase I vs Fase III)	0,343	0,093	0,674	0,013*	0,635	0,213	0,953	0,678
	Fase I	1,65	1,61	1,71	1,46	1,75	1,55	1,62	1,62
	p	-	0,499	0,634	0,038*	0,953	0,407	0,906	0,154
	Fase II	1,60	1,86	1,90	1,77	1,60	1,52	1,51	1,66
	Fase III	1,67	1,62	1,69	1,62	1,70	1,61	1,66	1,68
Endotelial dependente de NO	p (Fase I vs Fase II)	0,038*	0,575	0,859	0,021*	0,678	0,678	0,110	0,405
	p (Fase I vs Fase III)	0,678	0,123	0,286	0,008*	0,400	0,213	0,674	0,092
	Fase I	1,71	1,66	1,68	1,59	1,46	1,36	1,52	1,53
	p	-	0,400	0,553	0,068	0,441	0,123	0,859	0,092
	Fase II	1,54	1,55	1,70	1,64	1,64	1,58	1,60	1,57
Endotelial independente de NO	Fase III	1,73	1,73	1,80	1,84	1,63	1,71	1,71	1,72
	p (Fase I vs Fase II)	0,066	0,779	0,441	0,374	0,859	0,678	0,553	0,513
	p (Fase I vs Fase III)	0,594	0,069	0,139	0,008*	0,097	0,028*	0,594	0,008*
	Fase I	1,72	1,66	1,64	1,62	1,80	1,46	1,61	1,56
	p	-	0,150	0,213	0,018*	0,192	0,038*	0,173	0,008*
Endotelial independente de NO	Fase II	1,51	1,58	1,70	1,63	1,66	1,44	1,50	1,82
	Fase III	1,61	1,47	1,53	1,59	1,51	1,32	1,59	1,63
	p (Fase I vs Fase II)	0,011*	0,484	0,314	0,141	1,000	0,859	0,066	0,044*
	p (Fase I vs Fase III)	0,173	1,000	0,066	0,138	0,722	0,575	0,722	0,138

3.3.6. *Análise de entropia à multiescala*

3.3.6.1. Grupo controlo

Quando analisados em conjunto, a entropia do sinal e suas componentes ordena-se da seguinte forma: cardíaco > respiratória > sinal bruto > endotelial independente de NO > miogénica > simpática > endotelial dependente de NO. A entropia do sinal de LDF, bem como de todas as suas componentes, sofreu um aumento durante a fase de provocação versus estabilização, tendo sido significativa apenas para a componente endotelial dependente de NO ($p=0,001$).

Para os membros cuja perfusão aumentou, verificou-se o aumento da entropia do sinal e todas as suas componentes, de forma significativa para as componentes cardíaca e endotelial dependente de NO ($p=0,006$). Já na fase de recuperação a entropia do sinal e todas as suas componentes diminuiu, exceto a endotelial independente de NO. Nesta fase verificaram-se diferenças significativas para as componentes cardíaca ($p=0,012$), respiratória ($p=0,042$), simpática ($p=0,023$) e endotelial dependente de NO ($p=0,007$).

O perfil de entropia do membro que respondeu com aumento de perfusão foi diferente do anterior. Neste caso a entropia do sinal de LDF aumentou da estabilização para a provocação. O mesmo aconteceu, ao contrário do caso anterior, para as componentes miogénica e endotelial independente de NO. Já a entropia das componentes cardíaca, respiratória, simpática e endotelial dependente de NO, à semelhança do caso anterior, diminuiu durante a provocação, de forma significativa apenas para a componente endotelial dependente de NO ($p=0,034$). Na fase de recuperação os valores dos expoentes alfa não apresentaram diferenças face à fase de estabilização.

Tabela 65. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigênio a 100% (N=16, ambos os membros).

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Sinal de LDF	média ± dp	58,7 ± 7,1	59,0 ± 5,1	51,7 ± 10,8
	p	-	0,695	0,970
Cardíaca	média ± dp	67,4 ±	69,2 ± 3,6	63,9 ± 8,2
	p	-	0,112	0,004*
Respiratória	média ± dp	65,1 ± 6,7	65,8 ± 3,6	61,9 ± 9,6
	p	-	0,169	0,009*
Miogénica	média ± dp	16,7 ± 8,8	19,2 ± 7,4	13,6 ± 5,4
	p	-	0,100	0,061
Simpática	média ± dp	14,8 ± 8,0	15,9 ± 8,7	11,0 ± 4,7
	p	-	0,096	0,006*
Endotelial dependente de NO	média ± dp	11,7 ± 7,9	17,3 ± 9,5	8,9 ± 5,3
	p	-	0,001*	0,004*
Endotelial independente de NO	média ± dp	17,8 ± 7,2	18,2 ± 9,7	17,4 ± 9,9
	p	-	0,955	0,654

A entropia do sinal de LDF e suas componentes ordena-se do seguinte modo: cardíaca > respiratória > LDF > endotelial independente de NO > miogénica > simpática > endotelial dependente de NO. A entropia do sinal de suas componentes aumentou na fase de provocação, traduzindo um aumento da irregularidade que pode, por sua vez, estar associado à alteração da regulação da perfusão. A entropia do sinal e das suas componentes diminuiu durante a fase de recuperação, chegando a adotar valores significativamente inferiores aos da fase de estabilização para as componentes cardíaca (p=0,004), respiratória (p=0,009), simpática (p=0,006) e endotelial dependente de NO (p=0,004).

Tabela 66. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigênio a 100% nos membros que responderam com diminuição do sinal de LDF (N=16, ambos os membros).

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Sinal de LDF	média ± dp	58,9 ± 8,5	60,4 ± 5,5	52,4 ± 8,2
	p	-	0,654	0,940
Cardíaca	média ± dp	67,6 ± 4,4	69,4 ± 2,9	64,2 ± 5,9
	p	-	0,025*	0,012*
Respiratória	média ± dp	65,3 ± 5,8	66,3 ± 3,3	61,9 ± 8,7
	p	-	0,052	0,042*
Miogénica	média ± dp	16,2 ± 8,1	20,5 ± 7,0	13,6 ± 5,3
	p	-	0,167	0,167
Simpática	média ± dp	14,2 ± 6,9	15,5 ± 5,4	10,9 ± 4,4
	p	-	0,093	0,023*
Endotelial dependente de NO	média ± dp	11,8 ± 8,2	16,8 ± 10,3	8,3 ± 4,5
	p	-	0,006*	0,007*
Endotelial independente de NO	média ± dp	16,8 ± 6,8	18,0 ± 8,9	18,1 ± 10,5
	p	-	0,478	0,502

A entropia do sinal de LDF e suas componentes aumentou consistentemente na fase de provocação, mas de forma significativa apenas para a componente cardíaca ($p=0,025$) e endotelial Dependente de NO ($p=0,006$). Durante a recuperação a entropia diminuiu em todos os casos, significativamente para as componentes cardíaca ($p=0,012$), respiratória ($p=0,042$), simpática ($p=0,023$) e endotelial dependente de NO ($p=0,007$), enquanto sofreu um aumento não significativo da componente endotelial independente de NO.

Foram obtidas diferenças face a este perfil de resposta para os animais que responderam com aumento do sinal de fluxo. Nestes casos, a entropia do sinal de LDF e das componentes miogénica e endotelial independente de NO sofreu uma diminuição, apesar de sem significância estatística.

Tabela 67. Média e desvio-padrão (dp) do índice de complexidade do sinal de LDF e suas componentes nas três fases do protocolo de respiração de oxigênio a 100% nos membros que responderam com aumento do sinal de LDF (N=16, ambos os membros).

Componente		Estabilização	Provocação	Recuperação
Sinal de LDF	média ± dp	58,4 ± 4,1	56,8 ± 3,6	50,6 ± 14,4
	p	-	0,158	0,937
Cardíaca	média ± dp	67,1 ± 7,9	68,9 ± 3,8	63,5 ± 11,3
	p	-	0,754	0,099
Respiratória	média ± dp	64,8 ± 8,1	64,9 ± 4,1	61,9 ± 11,5
	p	-	0,814	0,099
Miogénica	média ± dp	17,7 ± 10,2	17,1 ± 7,9	13,5 ± 5,7
	p	-	0,239	0,272
Simpática	média ± dp	15,8 ± 9,8	16,5 ± 12,7	11,1 ± 5,3
	p	-	0,638	0,182
Endotelial dependente de NO	média ± dp	11,6 ± 7,6	18,2 ± 8,4	9,8 ± 6,6
	p	-	0,034*	0,308
Endotelial independente de NO	média ± dp	19,4 ± 8,0	18,5 ± 11,4	16,3 ± 9,1
	p	-	0,695	0,937

A MSE permitiu distinguir as diferentes respostas vasculares com base nos níveis de complexidade. Nos membros que responderam com diminuição de perfusão, a complexidade do sinal de LDF e de todas as suas componentes aumentou. Já nos membros que responderam com aumento de perfusão, a complexidade do sinal de LDF, e das componentes miogénica e endotelial independente de NO diminuíram, enquanto que a complexidade das restantes componentes aumentou.

3.3.6.2. Grupo de isquemia do membro inferior

O IC da componente miogénica diminuiu do dia 0 para o dia 4. Estes valores permaneceram significativamente mais baixos durante todo o período de acompanhamento face ao dia 0, exceto no dia 15, em que se observaram valores significativamente maiores. O IC da componente simpática permaneceu igualmente abaixo do valor do dia 0 durante o período de avaliação, embora nenhuma alteração tenha sido significativa. Para a componente endotelial dependente de NO detetaram-se diferenças significativas apenas nos dias 6 ($p=0,044$) e 35 ($p=0,028$), enquanto que para a componente independente de NO só foi encontrada uma diferença significativa no dia 4 ($p=0,012$).

Quanto ao efeito do teste de provocação, o IC da componente miogénica aumentou consistentemente em todos os dias de medição, mas apenas de forma significativa nos dias 0 ($p=0,008$) e 6 ($p=0,017$). O IC da componente simpática aumentou com a provocação nos dias 0, 4, 21 e 35, tendo diminuído nos restantes, mas sempre sem significância estatística. O IC da componente endotelial dependente de NO aumentou com a provocação em todos os dias de medição, mas de forma não significativa. Já o IC da componente endotelial independentemente de NO mostrou um perfil de evolução semelhante ao da componente simpática, tendo aumentado com a provocação nos dias 0, 4, 21 e 35 e diminuído nos restantes.

Assistiu-se à diminuição do IC de todas as componentes no dia 4, após a cirurgia. Tal diminuição traduz uma redução na variabilidade do sinal de LDF e, portanto, uma redução na heterogeneidade temporal da perfusão. Estes resultados sugerem que a entropia do sinal de LDF se altera durante o processo de recuperação funcional da perfusão do membro isquémico.

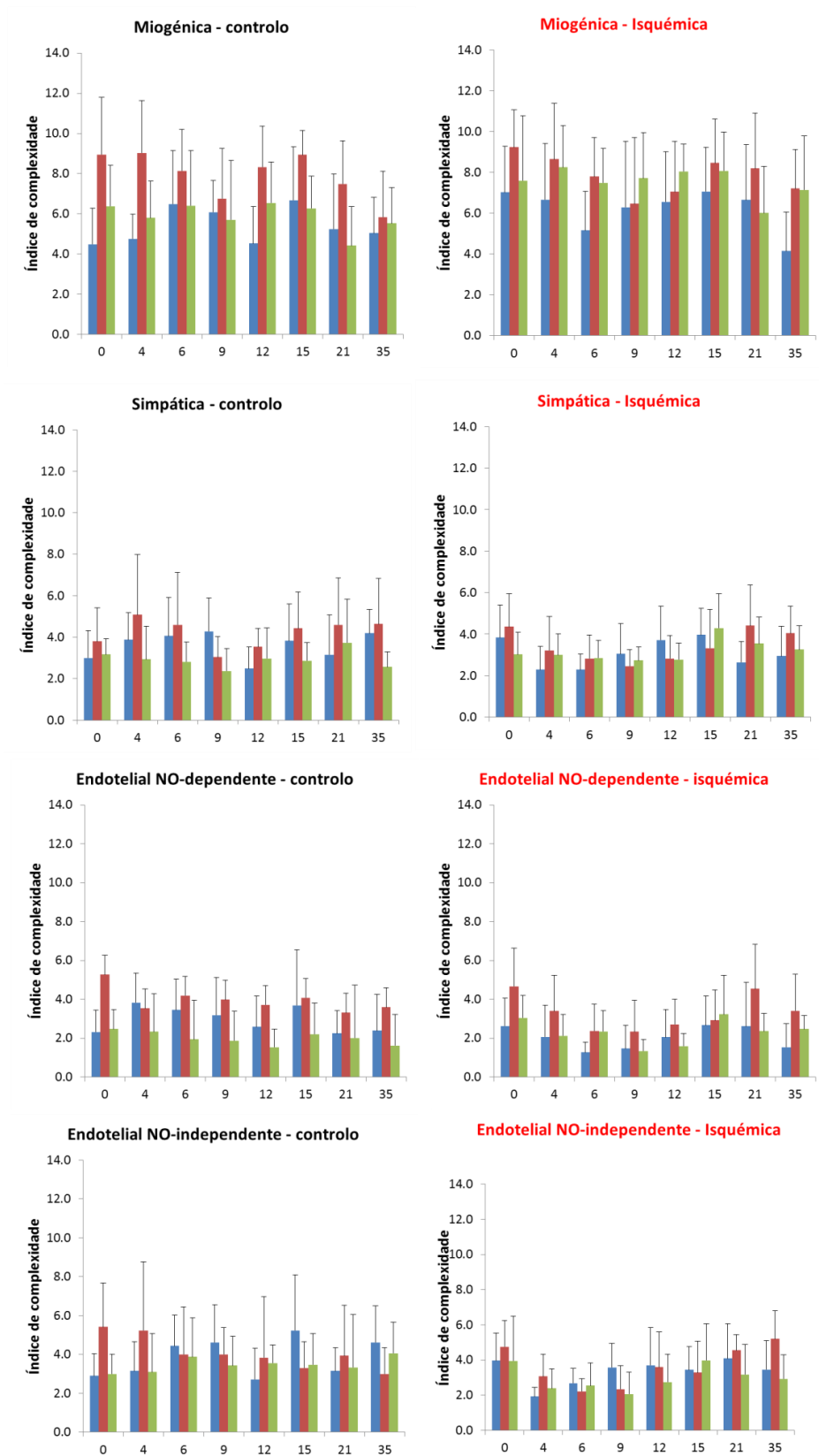


Figura 55. Evolução do índice de complexidade das componentes miogénica, simpática, endotelial dependente de NO e endotelial independente de NO nas fases de estabilização (azul), provocação (vermelho) e recuperação (verde).

Tabela 68. Índice de complexidade das componentes miogénica, simpática, endotelial dependente de NO e endotelial independente de NO para o membro isquémico nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos diferentes dias de análise (p<0,05; * - estatisticamente significativo).

Componente		Dia 0	Dia 4	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 15	Dia 21	Dia 35
Miogénica	Fase I	7,0	6,7	5,2	6,3	6,5	7,1	6,6	4,1
	p	-	0,012*	0,008*	0,008*	0,008*	0,008*	0,008*	0,008*
	Fase II	9,2	8,6	7,8	6,5	7,0	8,5	8,2	7,2
	Fase III	7,6	8,2	7,5	7,7	8,0	8,1	6,0	7,1
	P (Fase I vs Fase	0,008*	0,080	0,017*	0,767	0,767	0,086	0,139	0,051
Simpática	P (Fase I vs Fase	0,008*	0,069	0,038*	0,374	0,139	0,441	0,575	0,075
	Fase I	3,8	2,3	2,3	3,0	3,7	4,0	2,6	2,9
	p	-	0,123	0,066	0,515	0,678	0,678	0,109	0,286
	Fase II	4,4	3,2	2,8	2,5	2,8	3,3	4,4	4,0
	Fase III	3,0	3,0	2,9	2,7	2,8	4,3	3,5	3,3
Endotelial dependente de NO	P (Fase I vs Fase	0,374	0,058	0,123	0,312	0,441	0,139	0,021*	0,139
	P (Fase I vs Fase	0,086	0,123	0,191	0,726	0,138	0,594	0,139	0,286
	Fase I	2,6	2,1	1,3	1,5	2,0	2,7	2,6	1,5
	p	-	0,293	0,021*	0,085	0,441	0,722	0,859	0,021*
	Fase II	4,7	3,4	2,4	2,3	2,7	2,9	4,5	3,4
Endotelial independente de NO	Fase III	3,0	2,1	2,3	1,3	1,6	3,2	2,4	2,5
	P (Fase I vs Fase	0,066	0,050*	0,044*	0,173	0,260	0,722	0,092	0,028*
	P (Fase I vs Fase	0,343	1,000	0,008*	1,000	0,722	0,767	0,953	0,110
	Fase I	4,0	1,9	2,7	3,6	3,7	3,4	4,1	3,5
	p	-	0,012*	0,086	0,678	0,678	0,594	0,635	0,906
Endotelial independente de NO	Fase II	4,8	3,1	2,2	2,3	3,6	3,3	4,5	5,2
	Fase III	3,9	2,4	2,5	2,1	2,7	4,0	3,2	2,9
	p (Fase I vs Fase	0,213	0,093	0,182	0,108	0,859	0,574	0,342	0,038*
	p (Fase I vs Fase	0,859	0,293	0,767	0,069	0,401	0,635	0,343	0,635

Tabela 69. Índice de complexidade das componentes miogénica, simpática, endotelial dependente de NO e endotelial independente de NO para o membro controlo nas três fases do protocolo de respiração de oxigénio a 100% nos diferentes dias de análise ($p < 0,05$; * - estatisticamente significativo).

Componente		Dia 0	Dia 4	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 15	Dia 21	Dia 35
Miogénica	Fase I	4,5	4,8	6,5	6,1	4,5	6,7	5,2	5,1
	p	-	0,866	0,173	0,109	0,767	0,155	0,314	0,441
	Fase II	9,0	9,0	8,1	6,8	8,3	8,9	7,5	5,8
	Fase III	6,4	5,8	6,4	5,7	6,6	6,3	4,4	5,5
	P (Fase I vs Fase II)	0,021*	0,012*	0,139	0,138	0,013*	0,109	0,066	0,484
Simpática	P (Fase I vs Fase III)	0,075	0,042*	0,767	0,812	0,044*	0,553	0,343	0,812
	Fase I	3,0	3,9	4,1	4,3	2,5	3,8	3,1	4,2
	p	-	0,207	0,066	0,066	0,342	0,374	0,767	0,075
	Fase II	3,8	5,1	4,6	3,0	3,5	4,4	4,6	4,6
	Fase III	3,2	2,9	2,8	2,4	3,0	2,9	3,7	2,6
Endotelial dependente de NO	P (Fase I vs Fase II)	0,441	0,528	0,514	0,086	0,058	0,406	0,123	0,553
	P (Fase I vs Fase III)	0,553	0,263	0,086	0,013*	0,673	0,109	0,483	0,017*
	Fase I	2,3	3,8	3,4	3,2	2,6	3,7	2,2	2,4
	p	-	0,208	0,260	0,075	0,678	0,314	0,635	0,678
	Fase II	5,3	3,5	4,2	4,0	3,7	4,1	3,3	3,6
Endotelial independente de NO	Fase III	2,5	2,3	1,9	1,9	1,5	2,2	2,0	1,6
	P (Fase I vs Fase II)	0,011*	1,000	0,515	0,635	0,260	0,767	0,154	0,066
	P (Fase I vs Fase III)	0,575	0,069	0,097	0,021*	0,042*	0,139	0,678	0,161
	Fase I	2,9	3,1	4,4	4,6	2,7	5,2	3,1	4,6
	p	-	0,400	0,038*	0,110	0,678	0,066	0,407	0,109
Endotelial independente de NO	Fase II	5,4	5,2	4,0	4,0	3,8	3,3	3,9	3,0
	Fase III	3,0	3,1	3,9	3,4	3,6	3,5	3,3	4,1
	P (Fase I vs Fase II)	0,008*	0,092	0,722	0,440	0,859	0,173	0,767	0,066
	P (Fase I vs Fase III)	0,859	0,735	0,859	0,213	0,259	0,044*	0,779	0,515

Ao contrário do que se verificou para o membro isquémico, no membro controlo o IC de todas as componentes aumentou, de um modo geral, após a cirurgia. Este aumento dos valores de IC foi irregular, tendo-se revelado um único valor inferior ao do dia 0 – para as componentes miogénica, simpática e endotelial independente de NO no dia 12, e para a endotelial dependente de NO no dia 21.

A provocação com oxigénio aumentou consistentemente a entropia miogénica, mas de forma significativa nos dias 0 ($p=0,021$), 4 ($p=0,012$) e 12 ($p=0,013$). A entropia simpática aumentou consistentemente, à exceção do dia 9. Nenhuma alteração na entropia desta componente foi estatisticamente significativa. A entropia da componente endotelial dependente de NO aumentou consistentemente, à exceção do dia 4. A única alteração significativa foi no dia 0 ($p=0,011$). A alteração da entropia da componente endotelial independente de NO foi mais heterogénea, tendo aumentado nos dias 0, 4, 12 e 21 e diminuído nos restantes.

Capítulo IV : Conclusões

Tendo em conta a questão de investigação colocada, bem como os objetivos formulados e o delineamento experimental efetuado, são descritas de seguida as principais conclusões do presente estudo.

O primeiro objetivo permitiu estabelecer que, de entre os três protocolos experimentais propostos para o humano, o protocolo de respiração de oxigénio a 100% é o mais fácil de aplicar para os objetivos que delineámos. Mais, este protocolo permitiu esclarecer a natureza da resposta vascular humana à hiperóxia, um tema sempre controverso e insuficientemente tratado na literatura. Foram encontrados dois padrões de respostas à respiração de oxigénio – a diminuição de perfusão/vasoconstrição, o padrão dominante, e o aumento de perfusão/vasodilatação, um padrão encontrado em alguns dos indivíduos testados. Em qualquer caso, a análise dos sinais de LDF tratados por WT, DFA e MSE não permitiu encontrar diferenças estatisticamente significativas nas respostas vasculares entre indivíduos de idades diferentes, apesar das tendências consistentes que registámos, sendo ainda certo que todos os indivíduos estudados eram saudáveis.

A gasimetria transcutânea permitiu encontrar menores níveis de tcpO_2 em indivíduos mais velhos, quer em condições basais, quer durante a respiração de oxigénio propriamente dita. Estes resultados refletem uma redução da capacidade de extração de oxigénio em indivíduos mais velhos.

Os protocolos de elevação passiva da perna e de oclusão supra-sistólica mostraram produzir respostas vasculares semelhantes, consistindo em hiperémias compensatórias. No entanto, a análise dos parâmetros escolhidos para a caracterização do sinal de LDF não permitiu encontrar diferenças estatisticamente significativas nas respostas vasculares entre indivíduos de idades diferentes. Apesar disso, a área sob a curva da hiperémia era significativamente mais elevada no sexo masculino. Já o protocolo de elevação passiva permitiu revelar, nos indivíduos mais velhos, várias diferenças estatisticamente significativas, face aos mais jovens, entre as quais se destacam um maior nível de perfusão basal, uma maior redução percentual de perfusão provocada pela elevação, uma menor

área sob a curva do sinal de LDF durante a hiperémia e menores velocidades de decremento e incremento de tcpO_2 . Os resultados sugerem também que a recuperação da perfusão inicial após a hiperémia é mais rápida no sexo masculino. Foram ainda encontrados níveis de fluxo superiores e de tcpO_2 inferiores nos indivíduos mais velhos. O fluxo sanguíneo foi consistentemente mais elevado no sexo masculino, enquanto que a tcpO_2 foi consistentemente mais reduzida.

Neste contexto, o protocolo de elevação passiva da perna é uma alternativa útil à oclusão supra-sistólica, em contexto de investigação ou em contexto clínico, pela conveniência e conforto que envolve na perspetiva do indivíduo.

Nos três protocolos experimentais foram encontrados níveis de PTEA consistentemente mais elevados nos indivíduos mais velhos, sugerindo uma modificação na função de “barreira” cutânea com o avanço da idade, e igualmente mais elevados no sexo masculino. Encontraram-se ainda dois tipos de relação entre a perfusão e a PTEA – durante a oclusão e a respiração em hiperóxia encontrámos consistentes relações inversas, embora sem significância estatística. E estes aspetos chamam a nossa atenção para um assunto pouco estudado, mas, ainda assim, muito interessante, acerca da influência da perfusão na função de barreira “epidérmica” e que poderá ser aprofundado mais tarde.

O segundo objetivo justificou a aplicação das diferentes ferramentas de análise fina que seleccionámos para tratamento do sinal de LDF, sendo este o primeiro estudo que utilizou estas três estratégias de quantificação comparada em simultâneo. Desde já poderemos concluir que este objetivo revelou que a regulação da perfusão envolve a intervenção de diversos determinantes, locais e sistémicos, e que a sua intervenção regulatória varia com as condições da alteração que os ativa.

No modelo humano, a WT revelou ser a ferramenta mais útil para a distinção das diferentes respostas microvasculares, permitindo interpretações mais intuitivas da contribuição das diferentes componentes do sinal de LDF. Alguns aspetos essenciais revelados pela WT:

- o principal componente (amplitude normalizada) dos sinais de LDF no humano é de origem endotelial, seja qual for a manobra de provocação envolvida;

- no protocolo de elevação passiva da perna, a WT mostrou que a elevação envolve o aumento das atividades cardíaca e endotelial independente de NO, bem como a diminuição das atividades respiratória, miogénica, simpática e endotelial dependente de NO; existe uma atividade endotelial independente de NO reduzida nos indivíduos mais velhos face aos mais jovens.

- na oclusão supra-sistólica regista-se redução da atividade de todas as componentes, à exceção das endoteliais.

- a respiração em hiperóxia provoca o aumento das atividades cardíaca, respiratória e miogénica, mas reduz as atividades simpática e endoteliais; a redução de perfusão/vasoconstrição encontrada na maioria dos indivíduos parece dever-se à redução de ambas as atividades endoteliais, enquanto que o aumento de perfusão/vasodilatação registada em alguns indivíduos se parece dever ao aumento da atividade endotelial independente de NO.

A análise por DFA permitiu encontrar, diferentes comportamentos fractais nos sinais de LDF e suas componentes, mas apenas no período de estabilização. Estes comportamentos são semelhantes nas fases de estabilização, independentemente do teste dinâmico durante o qual foram registados.

- as componentes cardíaca e respiratória apresentaram consistentemente um comportamento $1/f$, enquanto que a miogénica, a simpática e as endoteliais apresentaram consistentemente um comportamento próximo do browniano.

- o comportamento fractal dos sinais e das suas componentes altera-se durante os testes aplicados, de modo diferente – (i) durante a elevação passiva da perna, o expoente alfa do sinal de LDF e da sua componente simpática sofrem diminuição, enquanto que o das restantes componentes sofrem aumento; (ii) na oclusão supra-sistólica, o expoente alfa do sinal de LDF e de todas as suas componentes aumenta. Os indivíduos mais velhos apresentam expoentes alfa da componente endotelial independente de NO menores que os de indivíduos jovens; (iii) na hiperóxia, o expoente alfa do sinal de LDF e das componentes cardíaca e endoteliais diminuem, enquanto as restantes aumentam.

Por seu lado, a MSE mostrou que os sinais de LDF e respetivas componentes, apresentam diferentes valores de complexidade. De um modo geral, nas fases de estabilização dos diferentes protocolos, a complexidade do sinal de LDF foi inferior à complexidade das componentes cardíaca e respiratória, mas superior à complexidade das componentes de atividade local. Esta ferramenta mostrou também que os valores de complexidade se alteram durante a aplicação das manobras dinâmicas:

- na elevação passiva da perna, a complexidade do sinal de LDF aumenta, enquanto que o de todas as suas componentes diminuem;

- com a oclusão supra-sistólica, a complexidade do sinal de LDF bem como de todas as suas componentes diminuem;

- na respiração com a atmosfera saturada de oxigénio, a complexidade do sinal de LDF e da sua componente cardíaca diminuem, a da componente respiratória permanece inalterada, e a das componentes de atuação local aumentam;

O terceiro objetivo permitiu demonstrar não apenas o interesse, mas, sobretudo, a importância e oportunidade do modelo animal que desenvolvemos com o protocolo de hiperóxia modificado, para o estudo da fisiologia e da patofisiologia da microcirculação, revelando diversos aspetos particulares da função até agora não publicados.

Este modelo, utilizando murganhos C57/BL6 anestesiados com quetamina/xilazina permitiu registar as respostas simultâneas nos membros posteriores revelando, à semelhança do que foi verificado no humano, os mesmos dois padrões de resposta - diminuição de perfusão/vasoconstrição, como padrão dominante, e aumento de perfusão/vasodilatação, como resposta num numero reduzido de indivíduos e alguns achados importantes conforme seguem:

- registámos pela primeira vez, a presença de respostas antagónicas numa e noutra pata posterior ao mesmo estímulo; este fenómeno poderá estar também presente no humano, embora não se encontre registado na literatura publicada;

- elaborámos, também pela primeira vez, a decomposição dos sinais de LDF com a transformada rápida de Fourier e com a WT, por forma a localizar a posição espectral de cada

componente. Identificámos no murganho seis bandas espectrais, como no humano, compatíveis com as atividades cardíaca (5,3 - 4,6 Hz), respiratória (3,8 - 3,2 Hz), miogénica (0,17 - 0,059 Hz), simpática (0,052 - 0,020 Hz), endotelial dependente de NO (0,017 - 0,0094 Hz), endotelial independente de NO (0,0084 - 0,0042 Hz); as bandas de atividade miogénica, simpática e endoteliais apresentam uma posição espectral semelhante em ambas as espécies.

- ao contrário do que encontrámos no humano, a principal (amplitude normalizada) componente do sinal de LDF é de origem miogénica; assim, a diminuição de perfusão/vasoconstrição registada na maioria dos indivíduos parece dever-se à diminuição de ambas as atividades endoteliais, enquanto que o aumento de perfusão/vasodilatação parece dever-se ao aumento da atividade endotelial dependente de NO.

- no modelo de isquémia provocada do membro posterior (*hindlimb*), a WT mostrou uma evolução consistentemente inversa das atividades miogénica e endotelial independente de NO no membro controlo, diminuindo a primeira e aumentando a segunda; no membro isquémico, a mesma evolução inversa foi notada na maior parte dos dias de acompanhamento, com a exceção do dia 15.

Ainda na exploração do modelo animal, a DFA mostrou que, tal como no humano, o sinal de LDF e as suas componentes cardíaca e respiratória apresentam um comportamento fractal do tipo $1/f$, enquanto as componentes miogénica, simpática e endoteliais apresentam um comportamento próximo do browniano:

- observámos diferentes alterações no valor dos expoentes alfa dos membros que responderam com diminuição e com aumento de perfusão; nos membros que responderam com diminuição de perfusão verificámos a diminuição do expoente alfa e de todas as componentes do sinal de LDF, enquanto que nos membros que responderam com aumento de perfusão, verificámos aumento do expoente alfa e da componente simpática, a inalteração da componente miogénica e a diminuição das restantes componentes.

A MSE permitiu, como no modelo humano, distinguir as diferentes respostas vasculares com base nos níveis de complexidade. Nos membros que responderam com diminuição de perfusão, a complexidade do sinal de LDF e de todas as suas componentes

aumentou, e, nos membros que responderam com aumento de perfusão, a complexidade do sinal de LDF, e das componentes miogénica e endotelial independente de NO diminuíram, enquanto que a complexidade das restantes componentes aumentou.

Assim, estas conclusões permitem elevar a hipótese formulada à categoria de tese e afirmar que:

- a fluxometria de laser-Doppler é uma poderosa tecnologia de avaliação quantitativa da microcirculação *in vivo*, desde que complementada com métodos e ferramentas de análise que ajudem a esclarecer a complexidade deste sinal oscilatório; neste contexto as metodologias propostas e os instrumentos testados (WT, DFA e MSE), permitem explorar de forma sensível os componentes daquele sinal e, perceber de que maneira os diferentes determinantes da perfusão local atuam, sobre estes marcadores, na regulação;

- o modelo animal aqui desenvolvido e proposto, corresponde a uma necessidade experimental importante, considerados não apenas a complexidade da fisiologia microcirculatória, e a heterogeneidade da patologia microvascular, estando demonstrado o seu interesse e potencial experimental, em diversos contextos de circulação normal e alterada.

Capítulo V : Referências bibliográficas

1. Hall JE, Guyton A. Guyton and Hall textbook of medical physiology. *Saunders Elsevier*, Filadélfia; 2011.
2. Shier D, Butler J, Lewis R. Hole's essentials of human anatomy and physiology: *McGraw-Hill*, Nova Iorque; 2006.
3. Westerhof N, Stergiopoulos N, Noble MI. Snapshots of hemodynamics: an aid for clinical research and graduate education. *Springer Science & Business Media*. 2010.
4. Chien S. Biophysical behavior of red cells in suspensions. *The Red Blood Cell*. 1975;2(4):1031-133.
5. Berne RM, Koeppen BM, Stanton BA. Berne & Levy's Physiology. *Elsevier*, Brasil; 2008.
6. Segura J, Banegas JR, Ruilope LM. Usefulness of ambulatory blood pressure monitoring (ABPM) in daily clinical practice: data from the Spanish ABPM registry. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2014;41(1):30-6.
7. Bohlen HG. The microcirculation and the lymphatic system. In: Textbook of Medical Physiology. *Saunders Elsevier*, Filadélfia; 1995.
8. Levy BI, Ambrosio G, Pries AR, Struijker-Boudier HAJ. Microcirculation in Hypertension. A New Target for Treatment? *Circulation*. 2001;104(6):735-40.
9. Verdant C, De Backer D. How monitoring of the microcirculation may help us at the bedside. *Current Opinion in Critical Care*. 2005;11(3):240-4.
10. Sakagami M, Harada T, Sano M, Sakai S, Matsunaga T. Quantitative evaluation of pinocytosis of capillaries of the *stria vascularis* under normal and experimental conditions. *Acta Otolaryngologica*. 1987;103(5-6):189-97.
11. Bevan JA, Laher I. Pressure and flow-dependent vascular tone. *The FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) Journal*. 1991;5(9):2267-73.
12. Jackson WF. Ion channels and vascular tone. *Hypertension*. 2000;35(1):173-8.
13. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Critical Care*. 2005;9(4):1.
14. Ellis C, Wrigley S, Groom A. Heterogeneity of red blood cell perfusion in capillary networks supplied by a single arteriole in resting skeletal muscle. *Circulation Research*. 1994;75(2):357-68.
15. Tymk K, Ellis CG, Safranyos RG, Fraser S, Groom AC. Temporal and spatial distributions of red cell velocity in capillaries of resting skeletal muscle, including estimates of red cell transit times. *Microvascular Research*. 1981;22(1):14-31.
16. Kvernmo HD, Stefanovska A, Bracic M, Kirkebøen KA, Kvernebo K. Spectral analysis of the laser Doppler perfusion signal in human skin before and after exercise. *Microvascular Research*. 1998;56(3):173-82.

17. Geyer MJ, Jan Y-K, Brienza DM, Boninger ML. Using wavelet analysis to characterize the thermoregulatory mechanisms of sacral skin blood flow. *Journal of Rehabilitation Research and Development*. 2004;41(6A):797.
18. Flavahan NA. The role of vascular α -2-adrenoceptors as cutaneous thermosensors. *Physiology*. 1991;6(6):251-5.
19. Flavahan NA. Phenylpropanolamine constricts mouse and human blood vessels by preferentially activating α 2-adrenoceptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;313(1):432-9.
20. Recio P, Orensanz LM, Martinez MP, Navarro-Dorado J, Bustamante S, Garcia-Sacristan A, Prieto D, Hernández M. Noradrenergic vasoconstriction of pig prostatic small arteries. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2008;376(6):397-406.
21. Bennett LAT, Johnson JM, Stephens DP, Saad AR, Kellogg DL. Evidence for a role for vasoactive intestinal peptide in active vasodilatation in the cutaneous vasculature of humans. *The Journal of Physiology*. 2003;552(1):223-32.
22. Wong BJ, Minson CT. Neurokinin-1 receptor desensitization attenuates cutaneous active vasodilatation in humans. *The Journal of Physiology*. 2006;577(3):1043-51.
23. Wong BJ, Wilkins BW, Minson CT. H1 but not H2 histamine receptor activation contributes to the rise in skin blood flow during whole body heating in humans. *The Journal of Physiology*. 2004;560(3):941-8.
24. McCord GR, Cracowski J-L, Minson CT. Prostanoids contribute to cutaneous active vasodilation in humans. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2006;291(3):R596-R602.
25. Roustit M, Cracowski J-L. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2013;34(7):373-84.
26. Kvietys PR. Regulation of Vascular Tone and Oxygenation. In: The Gastrointestinal Circulation. *Morgan & Claypool Life Sciences*, California; 2010.
27. Intaglietta M. Arteriolar vasomotion: implications for tissue ischemia. *Journal of Vascular Research*. 1991;28(1):1-7.
28. Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiological Reviews*. 1999;79(2):387-423.
29. Nilsson H, Aalkjær C. Vasomotion: mechanisms and physiological importance. *Molecular interventions*. 2003;3(2):79.
30. Davis MJ. Myogenic response gradient in an arteriolar network. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1993;264(6):H2168-H79.
31. Bračič M, Stefanovska A. Wavelet-based analysis of human blood-flow dynamics. *Bulletin of Mathematical Biology*. 1998;60(5):919-35.
32. Ursino M, Fabbri G. Role of the myogenic mechanism in the genesis of microvascular oscillations (vasomotion): analysis with a mathematical model. *Microvascular Research*. 1992;43(2):156-77.

33. Stergiopulos N, Porret CA, De Brouwer S, Meister JJ. Arterial vasomotion: effect of flow and evidence of nonlinear dynamics. *American Journal of Physiology*. 1998;274(6-2):H1858-64.
34. Intaglietta M. Vasomotion and flowmotion: physiological mechanisms and clinical evidence. *Vascular Medicine*. 1990;1(2):101-12.
35. Bayliss WM. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *The Journal of Physiology*. 1902;28(3):220.
36. Hübscher M, Vogt L, Banzer W. Wavelet analysis of laser-induced blood flow changes. *Medical Acupuncture*. 2007;19(1):13-6.
37. Schuster A, Oishi H, Bény J-L, Stergiopulos N, Meister J-J. Simultaneous arterial calcium dynamics and diameter measurements: application to myoendothelial communication. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001;280(3):H1088-H96.
38. Peng H, Matchkov V, Ivarsen A, Aalkjær C, Nilsson H. Hypothesis for the initiation of vasomotion. *Circulation Research*. 2001;88(8):810-5.
39. Siegel G. Principles of vascular rhythmogenesis. In: Vasomotion and Quantitative Capillaroscopy. Karger Publishers, Basel; 1983.
40. Gokina NI, Bevan RD, Walters CL, Bevan JA. Electrical activity underlying rhythmic contraction in human pial arteries. *Circulation Research*. 1996;78(1):148-53.
41. Povstyan O, Gordienko D, Harhun M, Bolton T. Identification of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein. *Cell Calcium*. 2003;33(4):223-39.
42. Goligorsky MS, Colflesh D, Gordienko D, Moore LC. Branching points of renal resistance arteries are enriched in L-type calcium channels and initiate vasoconstriction. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1995;268(2):F251-F7.
43. Fujii K, Heistad DD, Faraci FM. Vasomotion of basilar arteries in vivo. *The American Journal of Physiology*. 1990;258(6-2):H1829-34.
44. Gustafsson H. Vasomotion and underlying mechanisms in small arteries. An in vitro study of rat blood vessels. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum*. 1992;614:1-44.
45. Drummond HA, Grifoni SC, Jernigan NL. A new trick for an old dogma: ENaC proteins as mechanotransducers in vascular smooth muscle. *Physiology*. 2008;23(1):23-31.
46. Shu X, Keller IV TS, Begandt D, Butcher JT, Biwer L, Keller AS, Columbus L, Isakson BE. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015;72(23):4561-75.
47. Ozkor MA, Quyyumi AA. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function. *Cardiology Research and Practice*. 2011.
48. Goel A, Su B, Flavahan S, Lowenstein CJ, Berkowitz DE, Flavahan NA. Increased endothelial exocytosis and generation of endothelin-1 contributes to constriction of aged arteries. *Circulation Research*. 2010;107(2):242-51.
49. Dallinger S, Dorner GT, Wenzel R, Graselli U, Findl O, Eichler H-G, Wolzt M, Schmetterer L. Endothelin-1 contributes to hyperoxia-induced vasoconstriction in the human retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2000;41(3):864-9.

50. Higgins RD, Hendricks-Munoz KD, Caines VV, Gerrets RP, Rifkin DB. Hyperoxia stimulates endothelin-1 secretion from endothelial cells; modulation by captopril and nifedipine. *Current Eye Research*. 1998;17(5):487-93.
51. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Wacławiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO, Gladwin MT. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nature Medicine*. 2003;9(12):1498-505.
52. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*. 1996;380:221-226.
53. Ellsworth M. The red blood cell as an oxygen sensor: what is the evidence? *Acta Physiologica Scandinavica*. 2000;168(4):551-9.
54. Ellsworth ML, Forrester T, Ellis CG, Dietrich HH. The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1995;269(6):H2155-H61.
55. Bergfeld G, Forrester T. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovascular Research*. 1992;26(1):40-7.
56. Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Lonigro AJ. ATP: the red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1996;271(6):H2717-H22.
57. Semenza GL. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007;102(4):840-7.
58. Ucuzian AA, Gassman AA, East AT, Greisler HP. Molecular mediators of angiogenesis. *Journal of Burn Care & Research*. 2010;31(1):158.
59. Rouvière H, Delmas A. Anatomía humana: descriptiva, topográfica y funcional. *Masson*; 2005.
60. Putz R, Pabst R. Sobotta - Atlas of Human Anatomy: Head, Neck, Upper Limb, Thorax, Abdomen, Pelvis, Lower Limb. *Urban & Fischer*; 2006.
61. Kochi T, Imai Y, Takeda A, Watanabe Y, Mori S, Tachi M, Kodama T. Characterization of the arterial anatomy of the murine hindlimb: functional role in the design and understanding of ischemia models. *PLoS One*. 2013;8(12):e84047.
62. Cook MJ. The anatomy of the laboratory mouse. *Academic Press*, Massachusetts; 1965.
63. Strain WD, Adingupu DD, Shore AC. Microcirculation on a large scale: techniques, tactics and relevance of studying the microcirculation in larger population samples. *Microcirculation*. 2012;19(1):37-46.
64. Khan F, Litchfield SJ, Stonebridge PA, Belch JJ. Lipid-lowering and skin vascular responses in patients with hypercholesterolaemia and peripheral arterial obstructive disease. *Vascular Medicine*. 1999;4(4):233-8.
65. Rizzoni D, Porteri E, Boari GE, De Ciuceis C, Sleiman I, Muiesan ML, Castellano M, Miclini M, Agabiti-Rosei E. Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. *Circulation*. 2003;108(18):2230-5.

66. Stewart J, Kohen A, Brouder D, Rahim F, Adler S, Garrick R, Goligorsky MS. Noninvasive interrogation of microvasculature for signs of endothelial dysfunction in patients with chronic renal failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2004;287(6):H2687-H96.
67. Abahji TN, Nill L, Ide N, Keller C, Hoffmann U, Weiss N. Acute hyperhomocysteinemia induces microvascular and macrovascular endothelial dysfunction. *Archives of Medical Research*. 2007;38(4):411-6.
68. Rossi M, Carpi A. Skin microcirculation in peripheral arterial obliterative disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2004;58(8):427-31.
69. Shamim-Uzzaman QA, Pfenninger D, Kehrer C, Chakrabati A, Kacirotti N, Rubenfire M, Brook R, Rajagopalan S. Altered cutaneous microvascular responses to reactive hyperaemia in coronary artery disease: a comparative study with conduit vessel responses. *Clinical Science*. 2002;103(3):267-73.
70. Cui J, Arbab-Zadeh A, Prasad A, Durand S, Levine BD, Crandall CG. Effects of heat stress on thermoregulatory responses in congestive heart failure patients. *Circulation*. 2005;112(15):2286-92.
71. Green DJ, Maiorana AJ, Siong JHJ, Burke V, Erickson M, Minson CT, Bilsborough W, O'Driscoll G. Impaired skin blood flow response to environmental heating in chronic heart failure. *European Heart Journal*. 2006;27(3):338-43.
72. Boignard A, Salvat-Melis M, Carpentier PH, Minson CT, Grange L, Duc C, Sarrot-Reynauld F, Cracowski JL. Local hyperemia to heating is impaired in secondary Raynaud's phenomenon. *Arthritis Research & Therapy*. 2005;7(5):1.
73. Holowatz LA, Thompson CS, Kenney WL. L-Arginine supplementation or arginase inhibition augments reflex cutaneous vasodilatation in aged human skin. *The Journal of Physiology*. 2006;574(2):573-81.
74. Thompson CS, Holowatz LA, Kenney WL. Cutaneous vasoconstrictor responses to norepinephrine are attenuated in older humans. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2005;288(5):R1108-R13.
75. Thompson-Torgerson CS, Holowatz LA, Flavahan NA, Kenney WL. Rho kinase-mediated local cold-induced cutaneous vasoconstriction is augmented in aged human skin. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007;293(1):H30-H6.
76. Minson CT, Holowatz LA, Wong BJ, Kenney WL, Wilkins BW. Decreased nitric oxide-and axon reflex-mediated cutaneous vasodilation with age during local heating. *Journal of Applied Physiology*. 2002;93(5):1644-9.
77. Holowatz LA, Thompson-Torgerson CS, Kenney WL. The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. *Journal of Applied Physiology*. 2008;105(1):370-2.
78. Burton A. The range and variability of the blood flow in the human fingers and the vasomotor regulation of body temperature. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1939;127(3):437-53.
79. Charkoudian N. Mechanisms and modifiers of reflex induced cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans. *Journal of Applied Physiology*. 2010;109(4):1221-8.

80. Johnson JM, Proppe DW. Cardiovascular adjustments to heat stress. *Comprehensive Physiology*. 1996.
81. Sangiorgi S, Manelli A, Congiu T, Bini A, Pilato G, Reguzzoni M, Raspanti M. Microvascularization of the human digit as studied by corrosion casting. *Journal of Anatomy*. 2004;204(2):123-31.
82. Raspanti M. Plexiform vascular structures in the human digital dermal layer: a SEM–corrosion casting morphological study. *European Journal of Morphology*. 2005;42(4/5):173-7.
83. Lossius K, Eriksen M, Walløe L. Fluctuations in blood flow to acral skin in humans: connection with heart rate and blood pressure variability. *The Journal of Physiology*. 1993;460:641.
84. Thoresen M, Walløe L. Skin blood flow in humans as a function of environmental temperature measured by ultrasound. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1980;109(3):333-41.
85. Bergersen T, Hisdal J, Walløe L. Perfusion of the human finger during cold-induced vasodilatation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1999;276(3):R731-R7.
86. Bergersen T, Eriksen M, Walloe L. Local constriction of arteriovenous anastomoses in the cooled finger. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1997;273(3):R880-R6.
87. Flavahan NA. A vascular mechanistic approach to understanding Raynaud phenomenon. *Nature Reviews Rheumatology*. 2015;11(3):146-58.
88. Vetrugno R, Liguori R, Cortelli P, Montagna P. Sympathetic skin response. *Clinical Autonomic Research*. 2003;13:256-70.
89. Charkoudian N, editor. Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. *Mayo Clinic Proceedings, Elsevier*; 2003.
90. Zakharov P, Dewarrat F, Caduff A, Talary M. The effect of blood content on the optical and dielectric skin properties. *Physiological Measurement*. 2010;32(1):131.
91. Gude WD. Histological atlas of the laboratory mouse. *Springer*; 2012.
92. Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *BioMed Research International*. 2010;2011.
93. Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2014;14(5):289-301.
94. Abularrage CJ, Sidawy AN, Aidinian G, Singh N, Weiswasser JM, Arora S. Evaluation of the microcirculation in vascular disease. *Journal of Vascular Surgery*. 2005;42(3):574-81.
95. Bruckner G, Webb P, Greenwell L, Chow C, Richardson D. Fish oil increases peripheral capillary blood cell velocity in humans. *Atherosclerosis*. 1987;66(3):237-45.
96. Abbink EJ, Wollersheim H, Netten PM, Smits P. Reproducibility of skin microcirculatory measurements in humans, with special emphasis on capillaroscopy. *Vascular Medicine*. 2001;6(4):203-10.
97. Carpentier P. New techniques for clinical assessment of the peripheral microcirculation. *Drugs*. 1998;59:17-22.

98. Bongard O, Bounameaux H. Clinical investigation of skin microcirculation. *Dermatology*. 1993;186(1):6-11.
99. Shore AC. Capillaroscopy and the measurement of capillary pressure. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2000;50(6):501-13.
100. Bhattacharya J, Kanjilal PP, Muralidhar V. Analysis and characterization of photo-plethysmographic signal. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2001;48(1):5-11.
101. Bircher A, Boer EM, Agner T, Wahlberg JE, Serup J. Guidelines for measurement of cutaneous blood flow by laser Doppler flowmetry. *Contact Dermatitis*. 1994;30(2):65-72.
102. Murray A, Herrick A, King T. Laser Doppler imaging: a developing technique for application in the rheumatic diseases. *Rheumatology*. 2004;43(10):1210-8.
103. Leeson C, Robinson M, Francis J, Robson M, Channon K, Neubauer S, Wiesmann F. Cardiovascular magnetic resonance imaging for non-invasive assessment of vascular function: validation against ultrasound. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*. 2006;8(2):381-7.
104. Groner W, Winkelmann JW, Harris AG, Ince C, Bouma GJ, Messmer K, Nadeau RG. Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation. *Nature medicine*. 1999;5(10):1209-12.
105. Silva H, Ferreira H, Bujan MJ, Rodrigues LM. Regarding the quantification of peripheral microcirculation—Comparing responses evoked in the in vivo human lower limb by postural changes, suprasystolic occlusion and oxygen breathing. *Microvascular Research*. 2015;99:110-7.
106. Monnet X, Teboul J-L. Passive leg raising. *Intensive Care Medicine*. 2008;34(4):659-63.
107. Silva H, Ferreira H, Tavares L, Bujan J, Rodrigues L. Exploring in vivo models to characterize peripheral microcirculation—a pilot study. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*. 2013;10(1):65-72.
108. Herron R, Collins A, Carter S, Mitchell J, Bishop P. Skin blood flow response following repeated local heating (LB803). *The FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) Journal*. 2014;28(1):LB803.
109. Yamazaki F, Takahara K, Sone R, Johnson JM. Influence of hyperoxia on skin vasomotor control in normothermic and heat-stressed humans. *Journal of Applied Physiology*. 2007;103(6):2026-33.
110. Tikhonova IV, Tankanag AV, Chemeris NK. Time–amplitude analysis of skin blood flow oscillations during the post-occlusive reactive hyperemia in human. *Microvascular Research*. 2010;80(1):58-64.
111. Wendling W, Sadel S, Jimenez D, Rosenwasser R, Buchheit W. Cardiovascular and cerebrovascular effects of the applied Valsalva manoeuvre in anaesthetized neurosurgical patients. *European Journal of Anaesthesiology*. 1994;11(2):81-7.
112. Mayrovitz HN, Groseclose EE. Neurovascular responses to sequential deep inspirations assessed via laser-Doppler perfusion changes in dorsal finger skin. *Clinical Physiology and Functional imaging*. 2002;22(1):49-54.
113. Silva H, Ferreira H, Bujan J, Rodrigues LM. Exploring the oxygen challenge test as a microcirculation evaluation model. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*. 2013;10(2):209-15.

114. Cortés DO, Puflea F, Donadello K, Taccone FS, Gottin L, Creteur J, Vincent JL1, De Backer D. Normobaric hyperoxia alters the microcirculation in healthy volunteers. *Microvascular Research*. 2015;98:23-8.
115. Dimopoulos S, Tzanis G, Manetos C, Tasoulis A, Mpouchla A, Tseliou E, Vasileiadis I, Diakos N, Terrovitis J, Nanas S. Hyperoxia affects peripheral tissue microcirculation in patients with pulmonary arterial hypertension. *Critical Care*. 2012;16(1):1.
116. Ghiadoni L, Donald AE, Cropley M, Mullen MJ, Oakley G, Taylor M, O'Connor G, Betteridge J, Klein N, Steptoe A, Deanfield JE. Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans. *Circulation*. 2000;102(20):2473-8.
117. Kop WJ, Krantz DS, Howell RH, Ferguson MA, Papademetriou V, Lu D, Popma JJ, Quigley JF, Vernalis M, Gottdiener JS. Effects of mental stress on coronary epicardial vasomotion and flow velocity in coronary artery disease: relationship with hemodynamic stress responses. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001;37(5):1359-66.
118. Costello JT, McNamara P, O'Connell M-L, Algar L, Leahy M, Donnelly A. Tissue viability imaging of skin microcirculation following exposure to whole body cryotherapy (-110 C) and cold water immersion (8 C). *Archives of Exercise in Health and Disease*. 2013;4(1):243-50.
119. Caselli A, Hanane T, Jane B, Carter S, Khaodhiar L, Veves A. Topical methyl nicotinate-induced skin vasodilation in diabetic neuropathy. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2003;17(4):205-10.
120. Roskos K, Bircher A, Maibach H, Guy R. Pharmacodynamic measurements of methyl nicotinate percutaneous absorption: the effect of aging on microcirculation. *British Journal of Dermatology*. 1990;122(2):165-71.
121. Edvinsson M, Andersson SE, Xu C, Edvinsson L. Cigarette smoking leads to reduced relaxant responses of the cutaneous microcirculation. *Vascular Health and Risk Management*. 2008;4(3):699.
122. Kvandal P, Landsverk SA, Bernjak A, Stefanovska A, Kvernmo HD, Kirkebøen KA. Low-frequency oscillations of the laser Doppler perfusion signal in human skin. *Microvascular Research*. 2006;72(3):120-7.
123. Turner J, Belch JJ, Khan F. Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser Doppler imaging and iontophoresis. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2008;18(4):109-16.
124. Özbebit FY, Esen F, Güleç S, Esen H. Evaluation of forearm microvascular blood flow regulation by laser Doppler flowmetry, iontophoresis, and curve analysis: contribution of axon reflex. *Microvascular Research*. 2004;67(3):207-14.
125. Ciplak M, Pasche A, Heim A, Haerberli C, Waeber B, Liaudet L, Feihl F, Engelberger R. The vasodilatory response of skin microcirculation to local heating is subject to desensitization. *Microcirculation*. 2009;16(3):265-75.
126. Minson CT, Berry LT, Joyner MJ. Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating. *Journal of Applied Physiology*. 2001;91(4):1619-26.
127. Cankar K, Finderle Ž. Gender differences in cutaneous vascular and autonomic nervous response to local cooling. *Clinical Autonomic Research*. 2003;13(3):214-20.

128. Melik Z, Kobal J, Cankar K, Strucl M. Microcirculation response to local cooling in patients with Huntington's disease. *Journal of Neurology*. 2012;259(5):921-8.
129. Lenasi H. Assessment of human skin microcirculation and its endothelial function using laser Doppler flowmetry: *InTech Open Access Publisher*; 2011.
130. Riva CE. Basic principles of laser Doppler flowmetry and application to the ocular circulation. *In: Laser Scanning: Update 1. Springer, Países Baixos*; 2001.
131. Bonner R, Nossal R. Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue. *Applied Optics*. 1981;20(12):2097-107.
132. Morales F, Graaff R, Smit AJ, Bertuglia S, Petoukhova AL, Steenbergen W, Leger P, Rakhorst G. How to assess post-occlusive reactive hyperaemia by means of laser Doppler perfusion monitoring: application of a standardised protocol to patients with peripheral arterial obstructive disease. *Microvascular Research*. 2005;69(1):17-23.
133. Morales F. Improving the clinical applicability of laser Doppler perfusion monitoring. *University Library Groningen*; 2005.
134. Kvernmo HD, Stefanovska A, Kirkebøen KA, Kvernebo K. Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators. *Microvascular Research*. 1999;57(3):298-309.
135. Humeau A, Trzepizur W, Rousseau D, Chapeau-Blondeau F, Abraham P. Localization of transient signal high-values in laser Doppler flowmetry signals with an empirical mode decomposition. *Medical Physics*. 2009;36(1):18-21.
136. Berardesca E, Lévêque J-L, Masson P. EEMCO guidance for the measurement of skin microcirculation. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2002;15(6):442-56.
137. Kernick D, Tooke J, Shore A. The biological zero signal in laser Doppler fluximetry—origins and practical implications. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. 1999;437(4):624-31.
138. Gush R, King T. Investigation and improved performance of optical fibre probes in laser Doppler blood flow measurement. *Medical and Biological Engineering and Computing*. 1987;25(4):391-6.
139. Leahy M, De Mul F, Nilsson G, Maniewski R. Principles and practice of the laser-Doppler perfusion technique. *Technology and Health Care*. 1999;7(2-3):143-62.
140. Vongsavan N, Matthews B. Some aspects of the use of laser Doppler flow meters for recording tissue blood flow. *Experimental Physiology*. 1993;78(1):1-14.
141. Rajan V, Varghese B, van Leeuwen TG, Steenbergen W. Review of methodological developments in laser Doppler flowmetry. *Lasers in Medical Science*. 2009;24(2):269-83.
142. Newson T, Obeid A, Wolton R, Boggett D, Rolfe P. Laser Doppler velocimetry: the problem of fibre movement artefact. *Journal of Biomedical Engineering*. 1987;9(2):169-72.
143. Perimed. Laser Doppler Monitoring. Acedido a 15/04/2016, de <https://www.perimed-instruments.com/laser-doppler-monitoring>.
144. Takiwaki H. Measurement of transcutaneous oxygen tension. *In Hand Book of Non-Invasive Methods and the Skin* Ed. J. Serup & GBE Jemec. *CRC Press, Boca Raton*; 1995.

145. Lübbers D, Grossmann U. Gas exchange through the human epidermis as a basis of tcPo₂ and tcPco₂ measurements. *In: Continuous transcutaneous blood gas monitoring. Plenum Press, Nova Iorque e Londres; 1983.*
146. Pinnagoda J, Tupkek R, Agner T, Serup J. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. *Contact Dermatitis*. 1990;22(3):164-78.
147. Courage + Khazaka eG. Scientific Devices: Tewameter® TM 300. Alemanha. Acedido a 2016/05/03, de <http://www.courage-khazaka.de/index.php/en/products/scientific/139-tewameter>.
148. Association WM. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *The Journal of the American Medical Association*. 2013;310(20):2191.
149. Tsai FW, Tulsyan N, Jones DN, Abdel-Al N, Castronuovo JJ, Carter SA. Skin perfusion pressure of the foot is a good substitute for toe pressure in the assessment of limb ischemia. *Journal of Vascular Surgery*. 2000;32(1):32-6.
150. Jörneskog G, Brismar K, Fagrell B. Skin capillary circulation severely impaired in toes of patients with IDDM, with and without late diabetic complications. *Diabetologia*. 1995;38(4):474-80.
151. Bongard O, Bounameaux H, Fagrell B. Effects of oxygen inhalation on skin microcirculation in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation*. 1992;86(3):878-86.
152. Perimed. Laser Doppler Probes for Periflux System 5000. Suécia. Acedido a 2016/04/15, de: <https://www.perimed-instruments.com/upl/files/103718>.
153. Abu-Own A, Scurr JH, Coleridge Smith PD. Effect of leg elevation on the skin microcirculation in chronic venous insufficiency. *Journal of Vascular Surgery*. 1994;20(5):705-10.
154. Arosio E, De Marchi S, Prior M, Zannoni M, Lucchese L, Lechi A. Activity of cardiopulmonary baroreceptors, peripheral resistance and cutaneous microcirculation in patients with peripheral obstructive arterial disease. *Journal of Internal Medicine*. 2000;247(4):471-8.
155. Ferreira HA, Fernandes CD, Pinto PC, Rodrigues LM. Use of Wavelet Transforms and Detrended Fluctuation Analysis in the evaluation of human skin microcirculation. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*. 2011;9(1):79-86.
156. Larsson A, Uusijarvi J, Eksborg S, Lindholm P. Tissue oxygenation measured with near-infrared spectroscopy during normobaric and hyperbaric oxygen breathing in healthy subjects. *European Journal of Applied Physiology*. 2010;109(4):757-61.
157. Jörneskog G, Djavani K, Brismar K. Day-to-day variability of transcutaneous oxygen tension in patients with diabetes mellitus and peripheral arterial occlusive disease. *Journal of Vascular Surgery*. 2001;34(2):277-82.
158. Kamler M, Wendt D, Pizanis N, Milekhin V, Schade U, Jakob H. Deleterious effects of oxygen during extracorporeal circulation for the microcirculation in vivo. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2004;26(3):564-70.
159. Aboyans V, Criqui MH, Abraham P, Allison MA, Creager MA, Diehm C, Fowkes FG, Hiatt WR, Jönsson B, Lacroix P, Marin B, McDermott MM, Norgren L, Pande RL, Preux PM, Stoffers HE, Treat-Jacobson D; American Heart Association Council on Peripheral Vascular Disease; Council on Epidemiology and Prevention; Council on Clinical Cardiology; Council on Cardiovascular

Nursing; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia. Measurement and Interpretation of the Ankle-Brachial Index A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2012;126(24):2890-909.

160. Collaboration ABI. Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association*. 2008;300(2):197.

161. Gao J, Cao Y, Tung W-w, Hu J. Multiscale analysis of complex time series: integration of chaos and random fractal theory, and beyond. *John Wiley & Sons, Nova Jérсія*; 2007.

162. Gao J, Hu J, Liu F, Cao Y. Multiscale entropy analysis of biological signals: A fundamental bi-scaling law. *Frontiers in Computational Neuroscience*. 2015;9:64.

163. Landsverk SA, Kvandal P, Bernjak A, Stefanovska A, Kirkeboen KA. The effects of general anesthesia on human skin microcirculation evaluated by wavelet transform. *Anesthesia & Analgesia*. 2007;105(4):1012-9.

164. Stefanovska A, Krošelj P. Correlation integral and frequency analysis of cardiovascular functions. *Open Systems & Information Dynamics*. 1997;4(4):457-78.

165. Bollinger A, Yanar A, Hoffmann U, Franzeck U. Is High-Frequency Flux Motion due to Respiration or to Vasomotion Activity? In: Vasomotion and Flow Motion. *Karger Publishers, Basel*; 1993.

166. Rossi M, Carpi A, Di Maria C, Franzoni F, Galetta F, Santoro G. Skin blood flowmotion and microvascular reactivity investigation in hypercholesterolemic patients without clinically manifest arterial diseases. *Physiological Research*. 2009;58(1):39.

167. Stauss HM, Anderson EA, Haynes WG, Kregel KC. Frequency response characteristics of sympathetically mediated vasomotor waves in humans. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1998;274(4):H1277-H83.

168. Söderström T, Stefanovska A, Veber M, Svensson H. Involvement of sympathetic nerve activity in skin blood flow oscillations in humans. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2003;284(5):H1638-H46.

169. Wornell G. Fractal signals. In: The Digital Signal Processing Handbook. *CRC Press, Florida*; 1998.

170. Esen F, Esen H. Detrended fluctuation analysis of laser Doppler flowmetry time series: the effect of extrinsic and intrinsic factors on the fractal scaling of microvascular blood flow. *Physiological Measurement*. 2006;27(11):1241.

171. Esen F, Aydın GS, Esen H. Detrended fluctuation analysis of laser Doppler flowmetry time series. *Microvascular Research*. 2009;78(3):314-8.

172. Humeau A, Buard B, Mahé G, Rousseau D, Chapeau-Blondeau F, Abraham P. Multiscale entropy of laser Doppler flowmetry signals in healthy human subjects. *Medical Physics*. 2010;37(12):6142-6.

173. Guerreschi E, Humeau-Heurtier A, Bricq S, Mahé G, Leflheriotis G. Study of digital blood pressure and laser Doppler flowmetry signals through a multiscale analysis. In *Signal Processing Conference (EUSIPCO), 2012 Proceedings of the 20th European* (pp. 1796-1800). IEEE.

174. Watanabe E, Kiyono K, Hayano J, Yamamoto Y, Inamasu J, Yamamoto M, Ichikawa T, Sobue Y, Harada M, Ozaki Y. Multiscale Entropy of the Heart Rate Variability for the Prediction of an Ischemic Stroke in Patients with Permanent Atrial Fibrillation. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137144.
175. Cao H, Lake DE, Ferguson JE, Chisholm CA, Griffin MP, Moorman JR. Toward quantitative fetal heart rate monitoring. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2006;53(1):111-8.
176. Mizuno T, Takahashi T, Cho RY, Kikuchi M, Murata T, Takahashi K, Wada Y.. Assessment of EEG dynamical complexity in Alzheimer's disease using multiscale entropy. *Clinical Neurophysiology*. 2010;121(9):1438-46.
177. Liu Q, Chen Y-F, Fan S-Z, Abbod MF, Shieh J-S. EEG signals analysis using multiscale entropy for depth of anesthesia monitoring during surgery through artificial neural networks. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 2015.
178. Kaplanis PA, Pattichis CS, Zazula D. Multiscale entropy-based approach to automated surface EMG classification of neuromuscular disorders. *Medical & Biological Engineering & Computing*. 2010;48(8):773-81.
179. Norris PR, Anderson SM, Jenkins JM, Williams AE, Morris Jr JA. Heart rate multiscale entropy at three hours predicts hospital mortality in 3,154 trauma patients. *Shock*. 2008;30(1):17-22.
180. Nardelli M, Valenza G, Cristea IA, Gentili C, Cotet C, David D, Antonio Lanata, Enzo P. Scilingo. Characterizing psychological dimensions in non-pathological subjects through autonomic nervous system dynamics. *Frontiers in Computational Neuroscience*. 2015;9:37.
181. Stearns SD, Hush DR. Digital Signal Processing with Examples in MATLAB®. *CRC press*, Florida; 2002.
182. Sifuzzaman M, Islam M, Ali M. Application of wavelet transform and its advantages compared to Fourier transform. *Journal of Physical Sciences*. 2009;13:121-134.
183. Peng C-K, Buldyrev SV, Havlin S, Simons M, Stanley HE, Goldberger AL. Mosaic organization of DNA nucleotides. *Physical Review E*. 1994;49(2):1685.
184. Eke A, Herman P, Kocsis L, Kozak L. Fractal characterization of complexity in temporal physiological signals. *Physiological Measurement*. 2002;23(1):R1.
185. Peng CK, Havlin S, Stanley HE, Goldberger AL. Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series. *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*. 1995;5(1):82-7.
186. Costa M, Goldberger AL, Peng C-K. Multiscale entropy analysis of complex physiologic time series. *Physical Review Letters*. 2002;89(6):068102.
187. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109(10):1292-8.
188. Stabile E, Burnett MS, Watkins C, Kinnaird T, Bachis A, la Sala A, Miller JM, Shou M, Epstein SE, Fuchs S. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation*. 2003;108(2):205-10.
189. Renault MA, Chapouly C, Yao Q, Larrieu-Lahargue F, Vandierdonck S, Reynaud A, Petit M, Jaspard-Vinassa B, Belloc I, Traiffort E, Ruat M, Dupl  a C, Couffignal T, Desgranges C, Gadeau AP.

Desert hedgehog promotes ischemia-induced angiogenesis by ensuring peripheral nerve survival. *Circulation Research*. 2013;112(5):762-70.

190. Sönmez TT, Al-Sawaf O, Brandacher G, Kanzler I, Tuchscheerer N, Tohidnezhad M, Kanatas A, Knobe M, Fragoulis A, Tolba R, Mitchell D, Pufe T, Wruck CJ, Hölzle F, Liehn EA. A novel laser-Doppler flowmetry assisted murine model of acute hindlimb ischemia-reperfusion for free flap research. *PLoS One*. 2013;8(6):e66498.

191. Smith J, Van den Broek F, Martorell JC, Hackbarth H, Ruksenas O, Zeller W. Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: summary of the report of a FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments. *Laboratory Animals*. 2007;41(2):143-60.

192. Moor Instruments. Basic Theory and Operating Principles of Laser Doppler Blood Flow Monitoring and Imaging (LDF & LDI), Issue 1. Reino Unido. Acedido a 2016/04/20, de http://www.moor.co.uk/ckfinder/userfiles/files/Moor_Laser_doppler_theory_Issue_1.pdf.

193. Niiyama H, Huang NF, Rollins MD, Cooke JP. Murine model of hindlimb ischemia. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2009(23):e1035-e.

194. Jia Y, Qin J, Zhi Z, Wang RK. Ultrahigh sensitive optical microangiography reveals depth-resolved microcirculation and its longitudinal response to prolonged ischemic event within skeletal muscles in mice. *Journal of Biomedical Optics*. 2011;16(8):086004--6.

195. Rutlen DL, Wackers F, Zaret B. Radionuclide assessment of peripheral intravascular capacity: a technique to measure intravascular volume changes in the capacitance circulation in man. *Circulation*. 1981;64(1):146-52.

196. Kawasaki T, Uemura T, Matsuo K, Masumoto K, Harada Y, Chuman T, Murata T. The effect of different positions on lower limbs skin perfusion pressure. *Indian Journal of Plastic Surgery*. 2013;46(3):508-12.

197. Ishida A, Miyagi M, Kinjo K, Ohya Y. Age-and sex-related effects on ankle-brachial index in a screened cohort of Japanese: the Okinawa Peripheral Arterial Disease Study (OPADS). *European Journal of Preventive Cardiology*. 2014;21(6):712-8.

198. Baker H. Deperdition d'eau par voie transepidermique. *Annales de Dermatologie et de Syphiligraphie*. 1971;98:289-96.

199. Leveque J, Corcuff P, Rigal Jd, Agache P. *In vivo* studies of the evolution of physical properties of the human skin with age. *International Journal of Dermatology*. 1984;23(5):322-9.

200. Thune P, Nilsen T, Hanstad I, Gustavsen T, Lövig DH. The water barrier function of the skin in relation to the water content of stratum corneum, pH and skin lipids. The effect of alkaline soap and syndet on dry skin in elderly, non-atopic patients. *Acta Dermato-Venereologica*. 1987;68(4):277-83.

201. Ogrin R, Darzins P, Khalil Z. Age-related changes in microvascular blood flow and transcutaneous oxygen tension under basal and stimulated conditions. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2005;60(2):200-6.

202. Docherty JR. The effects of ageing on vascular α -adrenoceptors in pithed rat and rat aorta. *European Journal of Pharmacology*. 1988;146(1):1-5.

203. Weiss B, Greenberg L, Cantor E. Age-related alterations in the development of adrenergic denervation supersensitivity. *Federation Proceedings*. 1979;38(5):1915-21.

204. Merhi M, Helme R, Khalil Z. Age-related changes in sympathetic modulation of sensory nerve activity in rat skin. *Inflammation Research*. 1998;47(6):239-44.
205. Magerl W, Treede R-D. Heat-evoked vasodilatation in human hairy skin: axon reflexes due to low-level activity of nociceptive afferents. *The Journal of physiology*. 1996;497(3):837.
206. Khalil Z, Ralevic V, Bassirat M, Dusting G, Helme R. Effects of ageing on sensory nerve function in rat skin. *Brain Research*. 1994;641(2):265-72.
207. Bongard O, Krahenbuhl B. Predicting amputation in severe ischaemia. The value of transcutaneous PO₂ measurement. *Bone & Joint Journal*. 1988;70(3):465-7.
208. Firooz A, Sadr B, Babakoochi S, Sarraf-Yazdy M, Fanian F, Kazerouni-Timsar A, Nassiri-Kashani M, Naghizadeh MM, Dowlati Y. Variation of biophysical parameters of the skin with age, gender, and body region. *The Scientific World Journal*. 2012;2012:386936.
209. Ehlers C, Ivens U, Møller M, Senderovitz T, Serup J. Females have lower skin surface pH than men. *Skin Research and Technology*. 2001;7(2):90-4.
210. Wilhelm K-P, Cua AB, Maibach HI. Skin aging: effect on transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and casual sebum content. *Archives of Dermatology*. 1991;127(12):1806-9.
211. Rodrigues LM, Pinto PC, Leal A. Transcutaneous flow related variables measured in vivo: the effects of gender. *BMC dermatology*. 2001;1(1):1.
212. Rašić L, Čavka A, Bari F, Drenjančević I. Reproducibility of post-occlusion reactive hyperaemia assessed by laser Doppler flowmetry in young healthy women. *Periodicum Biologorum*. 2014;116(1):77-82.
213. Yvonne-Tee GB, Rasool AHG, Halim AS, Rahman ARA. Reproducibility of different laser Doppler fluximetry parameters of postocclusive reactive hyperemia in human forearm skin. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2005;52(2):286-92.
214. Strain WD, Chaturvedi N, Bulpitt CJ, Rajkumar C, Shore AC. Albumin Excretion Rate and Cardiovascular Risk Could the Association Be Explained by Early Microvascular Dysfunction? *Diabetes*. 2005;54(6):1816-22.
215. Cracowski J-L, Minson CT, Salvat-Melis M, Halliwill JR. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2006;27(9):503-8.
216. Henrion D. Pressure and flow-dependent tone in resistance arteries. Role of myogenic tone. *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux*. 2005;98(9):913-21.
217. Paniagua OA, Bryant MB, Panza JA. Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients. *Circulation*. 2001;103(13):1752-8.
218. Carlsson I, Sollevi A, Wennmalm Å. The role of myogenic relaxation, adenosine and prostaglandins in human forearm reactive hyperaemia. *The Journal of Physiology*. 1987;389:147-61.
219. Binggeli C, Spieker LE, Corti R, Sudano I, Stojanovic V, Hayoz D, Lüscher TF, Noll G. Statins enhance postischemic hyperemia in the skin circulation of hypercholesterolemic patients: a

monitoring test of endothelial dysfunction for clinical practice? *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;42(1):71-7.

220. Patterson G. The role of intravascular pressure in the causation of reactive hyperaemia in the human forearm. *Clinical Science*. 1956;15(1):17.

221. Rossi M, Carpi A, Di Maria C, Franzoni F, Galetta F, Santoro G. Post-ischaemic peak flow and myogenic flowmotion component are independent variables for skin post-ischaemic reactive hyperaemia in healthy subjects. *Microvascular Research*. 2007;74(1):9-14.

222. Bungum L, Kvernebo K, Øian P, Maltau JM. Laser Doppler-recorded reactive hyperaemia in the forearm skin during the menstrual cycle. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 1996;103(1):70-5.

223. Tenland T, Salerud E, Nilsson G, Oberg P. Spatial and temporal variations in human skin blood flow. *International Journal of Microcirculation, Clinical and Experimental*. 1982;2(2):81-90.

224. Caspary L, Creutzig A, Alexander K. Biological zero in laser Doppler fluxmetry. *International Journal of Microcirculation, Clinical and Experimental*. 1988;7(4):367-71.

225. Fagrell B, Nilsson G. Advantages and limitations of one-point laser Doppler perfusion monitoring in clinical practice. *Vascular Medicine*. 1995;6(2):97-101.

226. Fredriksson I, Fors C, Johansson J. Laser doppler flowmetry-a theoretical framework. Department of Biomedical Engineering, Linköping University. 2007.

227. Severinghaus J, Stafford M, Thunstrom A. Estimation of skin metabolism and blood flow with TcPO₂ and TcPCO₂ electrodes by cuff occlusion of the circulation. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 1978;22(s68):9-15.

228. Naylor P, Evans N. The action of locally applied barbiturates on skin oxygen tension and rate of oxygen utilization. *British Journal of Dermatology*. 1970;82(6):600-5.

229. Spence V, Beck JS. Transcutaneous measurement of PO₂ and PCO₂ in the dermis at the site of the tuberculin reaction in healthy human subjects. *The Journal of Pathology*. 1988;155(4):289-93.

230. Prens E, Joost T, Steketee J. Quantification of patch test reactions by transcutaneous PO₂ measurement. *Contact Dermatitis*. 1987;16(3):142-6.

231. Derraik JG, Rademaker M, Cutfield WS, Pinto TE, Tregurtha S, Faherty A, Peart JM, Drury PL, Hofman PL. Effects of age, gender, BMI, and anatomical site on skin thickness in children and adults with diabetes. *PLoS One*. 2014;9(1):e86637.

232. Dana R. Normobaric oxygen therapy. *Journal of Ophthalmic and Vision Research*. 2012;7(4):273-4.

233. O'Driscoll BR, Howard LS, Davison AG. BTS guideline for emergency oxygen use in adult patients. *Thorax*. 2008;63(6):vi1-68.

234. Branson RD, Robinson BR. Oxygen: when is more the enemy of good? *Intensive care medicine*. 2011;37(1):1-3.


235. de Graaff AE, Dongelmans DA, Binnekade JM, de Jonge E. Clinicians' response to hyperoxia in ventilated patients in a Dutch ICU depends on the level of FiO₂. *Intensive care medicine*. 2011;37(1):46-51.

236. Higgins V. Human physiology: the basis of medicine. *BMJ Publishing Group Ltd and British Association of Sport and Exercise Medicine*; 2006.
237. Rousseau A, Steinwall I, Woodson R, Sjöberg F. Hyperoxia decreases cutaneous blood flow in high-perfusion areas. *Microvascular Research*. 2007;74(1):15-22.
238. Seals DR, Johnson DG, Fregosi RF. Hyperoxia lowers sympathetic activity at rest but not during exercise in humans. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1991;260(5):R873-R8.
239. Hodous TK, Hankinson JL, Stark GP. Workplace measurement of respirator effects using respiratory inductive plethysmography. *The American Industrial Hygiene Association Journal*. 1989;50(7):372-8.
240. Siggaard-Andersen O, Garby L. The Bohr effect and the Haldane effect. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 1973;31(1):1-8.
241. Nattie E. CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Progress in neurobiology*. 1999;59(4):299-331.
242. Mayrovitz HN, Regan MB. Gender differences in facial skin blood perfusion during basal and heated conditions determined by laser Doppler flowmetry. *Microvascular Research*. 1993;45(2):211-8.
243. Cooke JP, Creager MA, Osmundson PJ, Shepherd JT. Sex differences in control of cutaneous blood flow. *Circulation*. 1990;82(5):1607-15.
244. Crandall C, Shibasaki M, Yen T. Evidence that the human cutaneous venoarteriolar response is not mediated by adrenergic mechanisms. *The Journal of Physiology*. 2002;538(2):599-605.
245. Henriksen O. Local sympathetic reflex mechanism in regulation of blood flow in human subcutaneous adipose tissue. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1977;450:1-48.
246. Kyriakides ZS, Koukoulas A, Paraskevaidis IA, Chrysos D, Tsiapras D, Galiotos C, Kremastinos DT. Does passive leg raising increase cardiac performance? A study using Doppler echocardiography. *International journal of cardiology*. 1994;44(3):288-93.
247. Wong DH, Tremper KK, Zaccari J, Hajduczek J, Konchigeri HN, Hufstedler SM. Acute cardiovascular response to passive leg raising. *Critical Care Medicine*. 1988;16(2):123-5.
248. Monnet X, Teboul J-L. Passive leg raising: five rules, not a drop of fluid! *Critical Care*. 2015;19(1):1.
249. Ping P, Johnson PC. Role of myogenic response in enhancing autoregulation of flow during sympathetic nerve stimulation. *American Journal of Physiology*. 1992;263(4-2):H1177-84.
250. Klijn E, Niehof S, Groeneveld AJ, Lima AP, Bakker J, van Bommel J. Postural change in volunteers: sympathetic tone determines microvascular response to cardiac preload and output increases. *Clinical Autonomic Research*. 2015;25(6):347-54.
251. Ballermann BJ, Dardik A, Eng E, Liu A. Shear stress and the endothelium. *Kidney International*. 1998; 54:S100-S8.
252. Tikhonova IV, Tankanag AV, Chemeris NK. Age-related changes of skin blood flow during postocclusive reactive hyperemia in human. *Skin Research and Technology*. 2013;19(1):e174-e81.

253. Hsieh H-J, Liu C-A, Huang B, Tseng AH, Wang DL. Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications. *Journal of Biomedical Science*. 2014;21(1):1.
254. Harder DR, Narayanan J, Birks EK, Liard JF, Imig JD, Lombard JH, Lange AR, Roman RJ. Identification of a putative microvascular oxygen sensor. *Circulation Research*. 1996;79(1):54-61.
255. Lombard JH, Hess ME, Stekiel WJ. Neural and local control of arterioles in SHR. *Hypertension*. 1984;6(4):530-5.
256. Kunert MP, Roman RJ, Falck JR, Lombard JH. Differential effect of cytochrome p-450 ω -hydroxylase inhibition on O₂-induced constriction of arterioles in SHR with early and established hypertension. *Microcirculation*. 2001;8(6):435-43.
257. Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiological Reviews*. 2002;82(1):131-85.
258. Harder D, Campbell W, Roman R. Role of cytochrome P-450 enzymes and metabolites of arachidonic acid in the control of vascular tone. *Journal of Vascular Research*. 1995;32(2):79-92.
259. Khatsenko OG, Gross SS, Rifkind AB, Vane JR. Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependent metabolism caused by immunostimulants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(23):11147-51.
260. Harder DR, Narayanan J, Gebremedhin D. Pressure-induced myogenic tone and role of 20-HETE in mediating autoregulation of cerebral blood flow. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2011;300(5):H1557-H65.
261. Funk W, Endrich B, Messmer K, Intaglietta M. Spontaneous arteriolar vasomotion as a determinant of peripheral vascular resistance. *International Journal of Microcirculation, Clinical and Experimental*. 1982;2(1):11-25.
262. Meininger G, Davis M. Cellular mechanisms involved in the vascular myogenic response. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1992;263(3):H647-H59.
263. Scotland RS, Chauhan S, Vallance PJ, Ahluwalia A. An Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Like Factor Moderates Myogenic Constriction of Mesenteric Resistance Arteries in the Absence of Endothelial Nitric Oxide Synthase-Derived Nitric Oxide. *Hypertension*. 2001;38(4):833-9.
264. Lipsitz LA. Dynamics of stability the physiologic basis of functional health and frailty. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2002;57(3):B115-B25.
265. Lipsitz LA, Goldberger AL. Loss of 'complexity' and aging: potential applications of fractals and chaos theory to senescence. *The Journal of the American Medical Association*. 1992;267(13):1806-9.
266. Rodrigues L, Pereira LM. Basal transepidermal water loss: right/left forearm difference and motoric dominance. *Skin Research and Technology*. 1998;4(3):135-7.
267. Park S, Lee J, Jo M-h, Na JH, Park S-G, Jang H-K, Kang SW, Kim JH, Kim BS, Park JH, Kwon IC1, Ryu JH, Kim K. In vivo monitoring of angiogenesis in a mouse hindlimb ischemia model using fluorescent peptide-based probes. *Amino Acids*. 2016:1-14.
268. van Hinsbergh VW, Engelse MA, Quax PH. Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006;26(4):716-28.

269. Green EL. Biology of the laboratory mouse. *McGraw-Hill*, Nova Iorque; 1966.
270. Waring WS, Thomson AJ, Adwani SH, Rosseel AJ, Potter JF, Webb DJ, Maxwell SR. Cardiovascular effects of acute oxygen administration in healthy adults. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2003;42(2):245-50.
271. Gifani P, Rabiee H, Hashemi M, Taslimi P, Ghanbari M. Nonlinear Analysis of Anesthesia Dynamics by Fractal Scaling Exponent. Engineering in Medicine and Biology Society, *EMBS'06 28th Annual International Conference of the IEEE*; 2006: IEEE.

Anexo 1

 CBIOS - UDE	Código: Code	Edição nº: Edition nr	Data: Date
	Título: Consentimento Informado Title		

Dados do participante

Nome: _____

Data de Nascimento: __/__/____

Código de Referência: _____

Código do Estudo: _____

--


O investigador responsável pelo presente projeto propôs-me participar num estudo de investigação desenvolvido sob responsabilidade do CBIOS - CENTRO DE INVESTIGAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E TECNOLOGIAS DA SAÚDE.

Foi-me explicada e afirmada a minha total liberdade para aceitar ou recusar participar neste estudo.

Tendo tomado conhecimento dos resultados do exame clínico preliminar realizado neste laboratório, li e compreendi com clareza as informações que se seguem:

Objetivo do estudo
Pretende-se investigar o impacto da elevação passiva do membro inferior, da oclusão suprasistólica e da respiração de oxigénio nas variáveis fisiológicas da circulação periférica

--	--

 CBIOS - UDE	Código: Code	Edição nº: Edition nr	Data: Date
	Título: Consentimento Informado Title		

Resumo da metodologia

O estudo é realizado num painel de 65 voluntários sem patologia cardiovascular. Cada voluntário realizará três protocolos experimentais:


1. O voluntário está sentado confortavelmente e respira ar ambiente durante 10 minutos. De seguida, o voluntário respira uma atmosfera normobárica saturada em oxigénio durante 10 minutos. Finalmente, o voluntário volta a respirar o ar ambiente por mais 10 minutos.
2. O voluntário está sentado confortavelmente, sendo colocada uma manga de pressão em torno do tornozelo. É feito um registo durante 10 minutos. De seguida, a manga de pressão é insuflada durante 3 minutos a 200 mmHg. Finalmente, a manga é desinsuflada e o registo é feito por mais 10 minutos.
3. O voluntário está em posição supina numa cama reclinável, com a cabeça apoiada numa almofada e fazendo ambas as pernas um ângulo de zero graus com o plano horizontal. É feito um registo em repouso durante 10 minutos. De seguida, a perna do voluntário é elevada passivamente (sem esforço) a 45 graus relativamente ao plano horizontal durante 10 minutos. Finalmente, a perna retorna à posição original e é feito um novo registo de 10 minutos.

Cronograma geral do estudo		
Visita (Participante)	Motivo experimental	Duração
Janeiro a Junho de 2013	Inclusão no estudo Realização dos protocolos experimentais	3h

As visitas terão lugar no laboratório da Unidade de Dermatologia Experimental da Universidade Lusófona, em Lisboa.

Compromissos fundamentais assumidos pelo voluntário
<ul style="list-style-type: none"> - Não consumir bebidas cafeinadas nem alcoólicas, nem aplicar produtos tópicos no pé 24 horas antes da realização dos protocolos experimentais; - Não tomar medicação vasoativa nos 5 dias anteriores ao dia da realização dos protocolos experimentais

	pg. 2
--	-------

 CBIOS - UDE	Código: Code	Edição nº: Edition nr	Data: Date
	Título: Consentimento Informado Title		

Riscos menores previsíveis

- Dor e dormência durante a insuflação da manga de pressão ao nível do tornozelo e sensação
- Sensação de secura da mucosa oral durante a respiração da atmosfera saturada em oxigénio;
- Dormência do pé durante a elevação passiva da perna.
- Eritema poderá persistir durante algumas horas na áreas da pele onde foi aplicada a sonda de gasimetria transcutânea;


Em caso de qualquer reação adversa ocorrida durante o estudo, tenho o direito a solicitar um exame clínico imediato. Poderei a todo o momento pedir informações complementares ao responsável pelo estudo. Foi-me ainda comunicado que o estudo, os seus objetivos e metodologias, foram ainda apreciados por uma Comissão de Ética, a qual emitiu o respetivo parecer favorável à sua realização.

Os dados que me dizem respeito (pessoais e clínicos) serão estritamente confidenciais. Autorizo que (em caso de necessidade) as áreas de pele interessadas sejam fotografadas. Não autorizo a consulta dos dados, exceto por pessoas relacionadas com o estudo e sua avaliação, incluindo monitores, auditores, Comissão de Ética e entidades regulamentares, os quais poderão aceder aos dados clínicos, em absoluto respeito pela sua confidencialidade, em conformidade com a Lei de Proteção de Dados Pessoais.

Se desejar, sou livre a qualquer momento de optar por parar a minha participação sem estar obrigado a qualquer justificação; em consonância, informarei o investigador responsável e não receberei qualquer indemnização.

Aceito, pois, participar livremente neste estudo nas condições assim especificadas.

	pg. 3
--	-------

 CBIOS - UDE	Código: Code	Edição nº: Edition nr	Data: Date
	Título: Consentimento Informado Title		

e comprometo-me por minha honra, e por minha livre vontade a, durante este estudo e durante o período de exclusão que me foi indicado a não aderir a qualquer outro estudo a desenvolver em humanos, mesmo que realizado por um investigador deste centro ou de qualquer outro.

O meu consentimento não dilui as responsabilidades dos organizadores do estudo.

Conservo todos os direitos que me são concedidos por lei.

Feito em ____ de _____ de _____

Assinatura dos Investigadores

Assinatura do voluntário

Responsáveis

Anexo 2

Dados do participante

Nome: _____

Data nascimento: ____/____/____

Idade: ____ anos

Sexo: _____

Grupo: _____

Pé: _____

Altura: ____ cm

Peso: ____ kg

Pressão Arterial braço; Frequência Cardíaca: ____/____ mm Hg; ____ bpm

Pressão Arterial tornozelo; Frequência Cardíaca: ____/____ mm Hg; ____ bpm

Questionário

1. Tem alguma doença cardiovascular?

____ Não

____ Sim - Qual ou quais? _____

2. Tem familiares em primeiro grau com doença cardiovascular?

____ Não

____ Sim - Que doença(s)? _____

3. É fumador(a) habitual?

____ Não

____ Sim – Quantos cigarros fuma, em média, por semana? ____/ semana

4. Fumou nas últimas 24 horas?

____ Não

____ Sim - Qual ou quais? _____

5. Toma alguma medicação regularmente?

____ Não

____ Sim - Qual ou quais? _____

6. Tomou alguma outra medicação nas últimas 24 horas?

____ Não

____ Sim – Qual/quais? _____

7. Aplicou algum produto tópico nos pés nas últimas 24 horas?

____ Não

____ Sim – Qual/quais? _____

8. Toma algum suplemento alimentar regularmente?

____ Não

____ Sim – Qual/quais? _____

9. Há quantas horas tomou a última refeição? _____

10. Pratica exercício físico regularmente?

____ Não

____ Sim – Qual a frequência por semana? ____/ semana

11. Praticou exercício físico nas últimas 24 horas?

____ Não

____ Sim

12. Teve febre nos últimos 5 dias?

____ Não

____ Sim

13. Consome regularmente bebidas cafeinadas?

____ Não

____ Sim - há quantas horas está sem consumir bebidas cafeinadas? _____

14. Tem ciclos menstruais regulares?

____ Não

____ Sim

15. Em que dia do ciclo menstrual atual se encontra? _____

ERRATA

Página	Linha	Onde se lê	Deveria ler-se
12	6	...(19-21)	...(18-20)
12	9	...(85)	... (21)
12	9	...(86)	...(22)
12	9	...(87)	...(23)
12	9	...(88)	...(24)
12	12	...(18)	...(25)
Entre as referências 22 e 84, todos os números avançam 4 valores. Ex: na página 12, a referência 22 passa a 26, e na página 25 a referência 84 passa a 88.			
27	10	59	63
27	12	59	63
31	13	59	63
38	24	Evaporimetria	Evaporimetria (Pinnagoda et al. 1990)
41	14	...e exclusão...	...e não-inclusão...
42	Antes da frase “A tabela 2...” deveria constar a frase “Para cada participante foi calculado o índice de massa corporal (IMC)”		
60	8	...foram divididas em 100 caixas de 5000 amostras cada”	“...foram divididos sucessivamente em caixas de dimensões cada vez menores, começando por 100 caixas e terminando em 5000 caixas, num total de 50 divisões”
65	1	...40 dias	...35 dias
65	2	...e 21...	...21 e 35...
104	14	0,0013	0,013
120	Na tabela 34, onde se lê “independente de” deveria ler-se “independente de NO”		
121	3	...movimento browniano...	...movimento browniano (Rajan et al. (2009). Review of methodological developments ...
148	1	...fluxo sanguíneo	...fluxo sanguíneo médio
148	Na tabela 52 onde se lêem os valores:		
	Isquêmico	Fase III	214.9 41.5 71.3 77.7 91.9 96.1 134.7 148.9
	deveriam ler-se		
	Isquêmico	Fase III	207,3 102,7 102,4 110,1 122,3 114,0 148,3 148,9

